

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCISCO DE OLIVEIRA CONRADO

OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS
(HEMOPLASMAS) EM ROEDORES (*Rattus norvegicus*) DO PASSEIO PÚBLICO E
ZOOLOGICO DE CURITIBA

CURITIBA

2014

FRANCISCO DE OLIVEIRA CONRADO

OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS
(HEMOPLASMAS) EM ROEDORES (*Rattus norvegicus*) DO PASSEIO PÚBLICO E
ZOOLOGICO DE CURITIBA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Alexander Welker Biondo

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Conrado, Francisco de Oliveira

Ocorrência e identificação de microplasmas hemotrópicos
(hemoplasmas) em roedores (*Rattus norvegicus*) do Passeio Público e
Zoológico de Curitiba. / Francisco de Oliveira Conrado. – Curitiba, 2014.
109f. : il. ; 30cm.

Orientador: Alexander Welker Biondo

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

1. Micoplasma. 2. Roedor. 3. Anemia. I. Título II. Biondo, Alexander
Welker. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Prof. Dr. Alexander Welker Biondo
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná



Profa. Dra. Ana Márcia Guimarães
Universidade de São Paulo - USP



Prof. Dr. Ivan Roque Barros Filho
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Suplente:

Profa. Dra. Rosana Nogueira de Moraes
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir o mestrando **Francisco de Oliveira Conrado**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Ocorrência e identificação de micoplasmas hemotrópicos (Hemoplasmas) em roedores (*Rattus norvegicus*) do Passeio Público e Zoológico de Curitiba", são de parecer favorável à aprovação do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 24 de Outubro de 2014



Prof. Dr. Ciro A. Oliveira Ribeiro
Deplo. Biologia Celular / UFPR
Me. 0342361

"I don't like rats any more than the next bloke, but they ain't wicked and cruel like people can be. They're just ratty in their habits."

Philip Pullman

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Alexander Welker Biondo, pela confiança.

À minha co-orientadora, Andrea Pires dos Santos, pela direção.

À minha orientadora, Joanne Belle Messick, pelo exemplo.

À minha parceira, Cristina Kraemer Zimpel, pela companhia.

À minha amiga, Maysa Pellizzaro, pelo abraço.

À minha guia, Naíla Cannes do Nascimento, pela salvação.

Aos demais, por tudo.

RESUMO

Micoplasmas hemotrópicos, também conhecidos como hemoplasmas, são bactérias pertencentes à classe Mollicutes, patógenos obrigatórios dos eritrócitos de uma diversidade de espécies animais. São responsáveis pelo desenvolvimento de quadro agudo caracterizado por anemia ou uma infecção crônica assintomática ou com variadas síndromes ainda pouco caracterizada podendo, inclusive, interferir em resultados de estudos experimentais em animais de pesquisa. Devido à incapacidade em cultivar estes organismos, técnicas moleculares tem sido utilizadas como padrão no seu diagnóstico e estudo, e novas espécies vem sendo descritas em todo o mundo, principalmente em animais silvestres e de vida livre. *Mycoplasma coccoides* e *Mycoplasma haemomuris* são os hemoplasmas mais comumente reconhecidos no sangue de roedores selvagens e de laboratório. Até o presente momento nenhum trabalho tratou de estudar a ocorrência, epidemiologia e caracterização clínica e molecular de hemoplasmas de roedores de vida livre no Brasil. Como a presença de animais selvagens em cativeiro em zoológicos inviabiliza a utilização de raticidas tóxicos ou anticoagulantes, a captura dos animais vivos tem sido utilizada como método de controle paliativo da infestação por roedores nestes locais. O objetivo deste estudo é investigar a ocorrência de micoplasmas hemotrópicos em ratazanas (*Rattus norvegicus*) de vida livre capturados no Passeio Público e Zoológico de Curitiba e comparar com variáveis hematológicas. Quarenta e três ratazanas foram capturadas entre o Passeio Público e o Zoológico de Curitiba, e 20 outras foram amostradas do criatório do Passeio Público, onde são mantidas para a alimentação dos animais carnívoros do acervo. Mais de sessenta e três por cento das ratazanas foram positivas em triagem universal para micoplasmas hemotrópicos por PCR quantitativa através de técnica de SYBR® Green. Uma amostra de ao menos 50% de cada T_M obtida foi submetida a sequenciamento e determinadas como *M. haemomuris* com exceção de uma amostra, 94% similar ao hemoplasma felino 'Candidatus *M. turicensis*'. Análise filogenética de um fragmento de aproximadamente 1300 pb do gene 16S rRNA revelou que esta amostra é homóloga a um micoplasma hemotrópico descrito infectando um rato de colheita europeu da espécie *Micromys minutus*. A relevância da presença de uma nova espécie de micoplasma hemotrópico infectando essas duas espécies diferentes de roedores de vida livre em continentes tão distantes é incerta. Não foram detectadas alterações estatisticamente significativas nos parâmetros hematológicos entre as ratazanas infectadas e não infectadas, o que corrobora o caráter de baixa patogenicidade e/ou infecção silenciosa destes microrganismos. Estes achados sugerem que hemoplasmas possivelmente são endêmicos na região de Curitiba, e a epidemiologia destes microrganismos precisa ser investigada, assim como seu impacto na fauna local, nos animais selvagens e de cativeiro dos parques, com especial atenção ao seu potencial zoonótico.

Palavras-chave: ratazana, anemia, hemoplasmosse.

ABSTRACT

Hemotropic mycoplasmas, also known as hemoplasmas, are bacteria belonging to the class Mollicutes, obligatory pathogens of the red blood cells of a variety of animal species. These organisms are responsible for the development of anemia and disease with acute or chronic course and may occur silently interfering with results of experimental studies in animal research. Due to the inability to cultivate these organisms, molecular techniques have been used as standard diagnosis and study, and new species are being described worldwide, mainly in wild and free living animals. *Mycoplasma coccoides* and *Mycoplasma haemomuris* are the most commonly recognized hemoplasmas in the blood of wild and laboratory rodents. To date no work attempted to study the incidence, epidemiology, and clinical and molecular characterization of hemoplasmas in free-ranging rodents in Brazil. As the presence of wild animals in captivity in zoos hinders the use of toxic rodenticides or anticoagulants, capturing live animals has been used as a method of palliative control of rodent infestation in these locations. The aim of this study is to investigate the occurrence of hemotropic mycoplasmas in free-ranging rats (*Rattus norvegicus*) captured in the Passeio Público and the Curitiba Zoo and compare with hematological parameters. Forty three rats were captured and 20 others were sampled from the nursery, where they are kept for feeding the carnivorous animals of the parks. 63.5% of rats were positive in universal screening for hemotropic mycoplasmas by quantitative PCR using the SYBR® Green technique. A sample of at least 50% of each T_M was subjected to sequencing and determined as *M. haemomuris* except for one sample, 94% similar to the feline hemoplasma 'C M. turicensis'. Phylogenetic analysis of a fragment of approximately 1300 bp of the 16S rRNA gene showed that this sample was homologous to a hemotropic mycoplasma described infecting a European harvest mouse (*Micromys minutus*). The relevance of the presence of a new species of hemoplasma infecting two different free-ranging rodent species in such distant continents is uncertain. No statistically significant changes in hematological parameters between infected and uninfected rats were found, which confirms the low pathogenicity and/or silent infection character of these microorganisms. These findings suggest that possibly hemoplasmas are endemic in the region, and the epidemiology of these organisms need to be investigated as well as its impact on local wildlife, captivity animals, with special attention to its zoonotic potential.

Key-words: rats, anemia, mycoplasmal disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1.** COLETA DE SANGUE POR PUNÇÃO INTRACARDÍACA. Coleta de amostras de sangue total em tubos a vácuo de 8,5 mL com ativador de coágulo e de 4 mL contendo EDTA K₂ (BD®, Becton & Dickinson, EUA) através de punção intracardíaca em ratazana anestesiada por inalação com Isoflurano.....41
- FIGURA 2.** ALINHAMENTO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA GAPDH E COMPARAÇÃO COM O GENOMA MURINO. Confirmação de que os *primers* previamente descritos para amplificação do gene da GAPDH apresentam 100% de identidade com o gene da GAPDH murino.44
- FIGURA 3.** REGIÃO UTILIZADA PARA DESENHOS DE PRIMERS FORWARD. Região do gene 16S rRNA de sequência similar entre seis diferentes micoplasmas hemotrópicos descritos em roedores utilizada para o desenho de dois *primers forward* alinhadas com o software Genomatix® v3.1.51
- FIGURA 4.** BOX PLOT LOCAL DE ORIGEM vs. HEMATÓCRITO. Diferença entre as médias dos hematócritos das amostras para os diferentes locais de origem das ratazanas (1 = Passeio Público; 2 = Zoológico; 3 = Criatório do Passeio Público).....59
- FIGURA 5.** BOX PLOT INFECÇÃO vs. HEMATÓCRITO. Todas as ratazanas agrupadas (0 = positivo, animais infectados; 1 = negativo, animais não infectados).....60
- FIGURA 6.** BOX PLOT INFECÇÃO vs. HEMATÓCRITO (RATAZANAS DO PASSEIO PÚBLICO) (0 = positivo, animais infectados; 1 = negativo, animais não infectados).....61
- FIGURA 7.** BOX PLOT INFECÇÃO vs. HEMATÓCRITO (RATAZANAS DO ZOOLÓGICO) (0 = positivo, animais infectados; 1 = negativo, animais não infectados).....61
- FIGURA 8.** BOX PLOT INFECÇÃO vs. HEMATÓCRITO (RATAZANAS DO CRIATÓRIO) (1 = positivo, animais infectados; 2 = negativo, animais não infectados).....62
- FIGURA 9.** BOX PLOT INFECÇÃO vs. PESO CORPORAL. Comparação das médias de peso de todas as ratazanas agrupadas (1 = positivo, animais infectados; 2 = negativo, animais não infectados).....62

- FIGURA 10.** BOX PLOT INFECÇÃO vs. PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL. Comparação das médias de PPT de todas as ratas agrupadas (1 = positivo, animais infectados; 2 = negativo, animais não infectados). ...63
- FIGURA 11.** ESFREGAÇO SANGUÍNEO DA AMOSTRA R10. Amostra positiva na técnica de SYBR® Green para a infecção por micoplasma hemotrópico. Estruturas compatíveis com micoplasmas hemotrópicos estão destacadas (setas). Coloração de May-Grünwald - Giemsa (630X).63
- FIGURA 12.** ESFREGAÇO SANGUÍNEO DA AMOSTRA R15. Amostra positiva na técnica de SYBR® Green para a infecção por micoplasma hemotrópico. Não há presença de estruturas compatíveis na superfície dos eritrócitos. Coloração de May-Grünwald - Giemsa (630X).64
- FIGURA 13.** BOX PLOT INFECÇÃO vs. MICROSCOPIA. Comparação entre amostras infectadas e não infectadas com a média de estruturas compatíveis com hemoplasmas por eritrócito (0 = positivo, animais infectados; 1 = negativo, animais não infectados).64
- FIGURA 14.** GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO. Amplificações positivas para amostras testadas por PCR convencional para o gene da GAPDH, apresentando banda de aproximadamente 400 pb.67
- FIGURA 15.** GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO. Reamplificações positivas das amostras que apresentaram resultado positivo para a infecção por micoplasma hemotrópico pela técnica de SYBR® Green, porém com $C_T > 34$. Bandas muito fracas de amplificações inespecíficas (dímeros de *primers* ou acúmulo de *primers* não hibridizados) podem ser observadas nos controles negativos.68
- FIGURA 16.** RESULTADO DO ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA R25. Amostra apresentando 94% de identidade com o micoplasma hemotrópico descrito em felinos '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (JQ689949.1).70
- FIGURA 17.** CROMATOGRAMA DO SEQUENCIAMENTO DA AMOSTRA R25. Análise cromatográfica da sequência parcial de aproximadamente 600 pb do gene 16S rRNA da amostra R25 no programa FinchTV Viewer versão 1.4.0.71
- FIGURA 18.** CURVA DE DISSOCIAÇÃO DA AMOSTRA R37. Curva de dissociação obtida a partir de PCR quantitativo através da técnica de SYBR® Green, apresentando apenas um pico único pra ambas as duplicatas.72

FIGURA 19. SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA R37. Sequência de 1148 nucleotídeos obtida através de banda purificada de gel de agarose em eluição de 19 ng/μL da amostra R37.....	72
FIGURA 20. TRAÇADO CROMATOGRÁFICO DO SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA R37. Análise cromatográfica da qualidade do sequenciamento de 1148 nucleotídeos da amostra R37.	73
FIGURA 21. SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA R25. Sequência de 1154 nucleotídeos obtida através de banda purificada de gel de agarose em eluição de 38 ng/μL da amostra R25.....	74
FIGURA 22. TRAÇADO CROMATOGRÁFICO DO SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA R25. Análise cromatográfica da qualidade do sequenciamento de 1154 nucleotídeos da amostra R25.	74
FIGURA 23. RESULTADO DO ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA R25. Amostra apresentando 98% de identidade com o micoplasma hemotrópico descrito em um pequeno roedor europeu da espécie <i>Micromys minutus</i> (KC863983.1).	75
FIGURA 24. ÁRVORE FILOGENÉTICA Análise filogenética das sequências parciais do gene 16S rRNA das amostras R25 (novo isolado - KM203857) e R37 (<i>Mycoplasma haemomuris</i> - KM258432) e organismos relacionados. Árvore construída pelo método de Neighbor-Joining e valores percentuais de bootstrap.....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	RELAÇÃO DE ALGUMAS ESPÉCIES INFECTADAS POR MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS. Relação de algumas espécies animais onde a infecção por micoplasmas hemotrópicos já foi relatada, as espécies da bactéria encontradas e referências.	29
TABELA 2.	REGIÕES CONSSERVADAS ENTRE DIFERENTES ESPÉCIES DE HEMOPLASMAS. Regiões com 100% de identidade entre seis diferentes espécies de micoplasmas hemotrópicos descritas em infecções em roedores.	48
TABELA 3.	RELAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NESTE ESTUDO. Nome, sequência e referência dos <i>primers</i> utilizados e/ou desenhados e sintetizados para uso neste estudo.	50
TABELA 4.	DADOS HEMATOLÓGICOS E CARACTERÍSTICAS DAS RATAZANAS AMOSTRADAS. Local e origem e/ou captura, hematórito (HT %) e proteína plasmática total (PPT g/dL), peso (g) e sexo das ratazanas amostradas neste projeto.	55
TABELA 5.	VARIÁVEIS AGRUPADAS DE TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS. Peso (g), hematócrito (%) e proteína plasmática total (g/dL) de todas as ratazanas agrupadas.	57
TABELA 6.	VARIÁVEIS AGRUPADAS DE TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS. Peso (g), hematócrito (%) e proteína plasmática total (g/dL) das ratazanas amostradas separadas pelos locais de origem/captura.	57
TABELA 7.	VARIÁVEIS AGRUPADAS DE TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS. Peso (g), hematócrito (%) e proteína plasmática total (g/dL) das ratazanas amostradas separadas por status de infecção (positivo/negativo).	58
TABELA 8.	VARIÁVEIS AGRUPADAS DE TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS. Peso (g), hematócrito (%) e proteína plasmática total (g/dL) das ratazanas amostradas separadas por local de origem/captura e status de infecção (positivo/negativo).	58

TABELA 9.	VARIÁVEIS AGRUPADAS DE TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS. Peso (g), hematócrito (%) e proteína plasmática total (g/dL) das ratazanas amostradas separadas por sexo.	57
TABELA 10.	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS DAS AMOSTRAS EXTRAÍDAS. Resultados da análise das amostras por NanoDrop 2000c (ThermoScientific), para a quantificação de ácidos nucleicos.....	65
TABELA 11.	RELAÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PELA TÉCNICA DE SYBR® GREEN. Amostras positivas para infecção por hemoplasmas separadas por local de origem/captura e temperatura de <i>melting</i> obtida na curva de dissociação pela técnica de PCR quantitativo baseada na técnica de SYBR® Green.	67
TABELA 12.	RESULTADOS DO SE QUENCIAMENTO DE AMOSTRAS POSITIVAS. Sequências parciais do gene 16S rRNA de 28 amostras amplificadas, sequenciadas e comparadas com sequências depositadas no Genbank. Espécie identificada, percentual de identidade e números de acesso.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Símbolo de percentagem
<	Símbolo de menor que
=	Símbolo de igual a
±	Símbolo de mais ou menos
®	Símbolo de marca registrada
°C	Graus centígrados
16S rRNA	Parte da subunidade pequena (30S) do ácido ribonucleico ribossomal de procariotos
23S rRNA	Parte da subunidade grande (50S) do ácido ribonucleico ribossomal de procariotos
3'	Símbolo da extremidade três linha ou OH (oxidrila) livre
5'	Símbolo da extremidade cinco linha ou H (hidroxila) livre
BLASTn	Basic Local Aligment Search Tool nucleotide
Corp.	Corporação
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Deoxinucleosídeo trifosfato (dATP – deoxiadenosina, dGTP - deoxiguanosina, dCTP - deoxicitidina, dTTP – deoxitirosina)
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
et al.	e outros
EUA	Estados Unidos da América
Fw	<i>Forward</i>
g/dL	Gramas por decilitro
g/L	Gramas por litro
HT	Hematócrito
Inc.	Incorporação
Kb	Kilobases
L/L	Litro por litro
Ladder	Marcador de peso molecular
MEGA 6	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
Min	Minutos
Seg	Segundos
mL	Mililitros
mM	Milimol
mm ³	Milímetros cúbicos
N	Tamanho de amostra
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetros
p	Valor de p
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial hidrogeniônico
PPT	Proteína plasmática total
Primers	Iniciadores oligonucleotídeos

RNAse	Ribonuclease P
Rv	<i>Reverse</i>
™	Símbolo de trade market / Mercado de comércio
T _M	Símbolo de melting temperature / temperatura de anelamento
Tris-HCl	Tris-hidroximetil-aminometano-ácido clorídrico
U	Unidades
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UV	Ultra violeta
V	Volts
X	Vezes
x10 ³	Vezes 1.000
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
µmol	Pico mol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 GERAIS.....	16
2.2 ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 MORFOLOGIA	18
3.2 DIAGNÓSTICO	18
3.3 PATOGENIA	20
3.4 TRANSMISSÃO	23
3.5 TRATAMENTO.....	26
3.6 OCORRÊNCIA.....	27
3.7 HEMOPLASMAS EM ROEDORES.....	29
3.8 POTENCIAL ZONÓTICO	32
3.9 IMPORTÂNCIA EM PESQUISA.....	35
3.10 DETERMINAÇÃO DE GENOMAS COMPLETOS.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 CAPTURA E COLETA DE AMOSTRAS.....	40
4.2 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....	42
4.3 ANÁLISES SOROLÓGICAS	42
4.4 ANÁLISES MOLECULARES.....	43
4.4.1 PCR Convencional para o gene GAPDH	43
4.4.2 Triagem Universal para Hemoplasmas	45
4.4.2.1 Reamplificação de Amostras Suspeitas	46
4.4.3 Triagem para Hemoplasmas de Roedores.....	47
4.4.3.1 Desenho de <i>Primers</i>	47
4.4.3.2 Reação de PCR Convencional.....	48
4.4.3.3 Purificação de Bandas no Gel	49
4.4.3.4 Sequenciamento	50
4.4.4 Amplificação de um Amplicon de 1300 pb Para Sequenciamento	50
4.4.4.1 Desenho de <i>primers</i>	50
4.4.4.2 Reação de PCR Covencional.....	51

4.4.4.3 Sequenciamento	52
4.4.4.4. Números de Acessos das Sequências de Nucleotídeos	52
4.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA	53
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	53
5 RESULTADOS.....	55
5.1 MICROSCOPIA.....	63
5.3 ANÁLISES MOLECULARES.....	65
5.3.1 PCR Convencional para GAPDH	66
5.3.2 Triagem Universal para Hemoplasmas (SYBR® Green).....	67
5.3.3 Reamplificação de Amostras Suspeitas	68
5.3.5 RESULTADOS SEQUENCIAMENTO DE 1300pb	71
5.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA	76
6 DISCUSSÃO	78
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXOS	104

1 INTRODUÇÃO

Roedores de vida livre, em especial as espécies sinantrópicas, podem causar grandes prejuízos à saúde, agindo como transmissores de uma série de doenças ao homem e a outros animais, participando da cadeia epidemiológica de pelo menos trinta zoonoses. Leptospirose, peste bubônica, tifo murino, hantavirose, salmonelose, leishmaniose e brucelose são algumas das doenças nas quais o roedor participa direta ou indiretamente (BRASIL, 2006).

Em casos de infestação, uma das técnicas para realização de censo para roedores é a armadilha de captura viva. Contudo, tais determinações são complexas, uma vez que populações de roedores sinantrópicos são dinâmicas, móveis e variáveis, dependendo do habitat e das fontes de alimento. Esta técnica é informativa, já que permite estimar o número de roedores estudados e fazer uma investigação valiosa com informações quanto a gênero, estrutura etária e padrões de circulação da população de roedores (SPAULDING; JACKSON, 1983).

O Passeio Público e o Zoológico de Curitiba não possuem um plano de controle de pragas e roedores eficiente. A manutenção dos animais de cativeiro nesses locais dificulta a utilização de raticidas tóxicos ou anticoagulantes devido ao risco de contaminação pelos animais. A captura dos animais vivos tem sido utilizada como método de controle paliativo da infestação por roedores nestes locais, na tentativa de reduzir o número destes animais.

Micoplasmas hemotrópicos, também chamado de hemoplasmas, são causadores de anemia infecciosa em inúmeras espécies de mamíferos (WILLI et al., 2006). Podem ser agentes oportunistas, infectando silenciosamente animais saudáveis e levando à doença apenas em determinadas situações (FIRMINO, 2008). Sua transmissão ocorre por meio de vetores artrópodes hematófagos como carrapatos, pulgas, piolhos, moscas e mosquitos (NEIMARK et al., 2001).

Diversas espécies de animais domésticos e selvagens que habitam o território brasileiro podem apresentar infecção por hemoplasmas, e estudos devem ser conduzidos para que se estabeleçam reservatórios, hospedeiros e novas espécies de micoplasmas hemotrópicos no país. A ocorrência destes organismos em roedores de vida livre em locais onde animais são mantidos em cativeiro, como no Passeio Público e no Zoológico de Curitiba, pode significar risco de transmissão para os mesmos. Além disso, os riscos inerentes ao papel do roedor como vetor de outras doenças, tanto

para os animais como para os humanos, trabalhadores e visitantes do parque, comprovam a necessidade da obtenção de informações da dinâmica populacional e *status* infeccioso destes animais nestes locais.

Apesar de serem agentes infecciosos predominantemente de animais, em humanos existe uma possível associação entre infecção crônica por micoplasmas hemotrópicos e doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e doenças reumáticas, além da provável atuação como cofator em infecções retrovirais como a AIDS (MESSICK, 2004). Diversos outros relatos sugerem a possibilidade de infecções zoonóticas por hemoplasmas (TASKER et al., 2010), comprovando a importância do estudo desses microrganismos.

Devido à dificuldade de crescimento em meios de cultura, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um dos métodos utilizados para sua identificação além da observação microscópica em esfregaços, apesar da baixa sensibilidade desta (TASKER et al., 2010). Diversos pares de *primers* tem sido descritos no diagnóstico de hemoplasmas por PCR convencional, PCR quantitativo (TaqMan® ou SYBR® Green) e para o sequenciamento das espécies que infectam diferentes hospedeiros. Estudos de análise filogenética das diferentes espécies de hemoplasmas são frequentes na literatura e recentemente, novas linhagens variantes ou novas espécies de hemoplasmas tem sido relatadas.

Estudos relacionados aos hemoplasmas estão se tornando cada vez mais frequentes no Brasil. Contudo, ainda não são suficientes para determinar a importância dos hemoplasmas como agentes infecciosos. Pesquisas futuras devem ser conduzidas para que se conheça seu impacto clínico e epidemiológico em animais silvestres, de companhia, de produção e laboratório, assim como seu papel como agente zoonótico, particularmente em pacientes superexpostos ou imunocomprometidos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

- Verificar a ocorrência de micoplasmas hemotrópicos em roedores sinantrópicos (*Rattus norvegicus*) do Passeio Público e Zoológico de Curitiba.

2.2 ESPECÍFICOS

- Capturar ratazanas (*Rattus norvegicus*) de vida livre no Passeio Público e Zoológico de Curitiba e amostrar ratazanas do Criatório do Passeio Público, e coletar sangue através de punção intracardíaca;
- Pesquisar a presença de estruturas compatíveis com micoplasmas hemotrópicos em esfregaços sanguíneos corados;
- Detectar molecularmente por meio da amplificação parcial do gene 16S rRNA pela técnica de PCR quantitativa baseada no princípio de SYBR® Green (WILLI et al., 2009) micoplasmas hemotrópicos em ratazanas (*Rattus norvegicus*) do Passeio Público e Zoológico de Curitiba, caracterizar amostras positivas por sequenciamento, e estabelecer sua ocorrência nesta espécie;
- Identificar alterações hematológicas (hematócrito e proteína plasmática total) e comparar com infecção por micoplasmas hemotrópicos em roedores (*Rattus norvegicus*).

3 REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Mycoplasma* compreende um grupo de bactérias de tamanho diminuto e desprovidas de parede celular. Os membros deste gênero possuem um dos menores genomas registrados em procariotos (HOLT et al., 1994). São bactérias pleomórficas, que se coram negativamente pelo método de Gram, apresentam limitada atividade de biossíntese, proliferando-se aderidas a uma célula hospedeira e dependendo do fornecimento de nutrientes como aminoácidos, ácidos graxos, colesterol e vitaminas para o seu desenvolvimento (MESSICK, 2004).

Dentro deste gênero, os micoplasmas hemotrópicos, também conhecidos como hemoplasmas, são agentes causativos de anemia infecciosa em uma variedade de espécies animais. Podem causar anemia hemolítica aguda ou doenças crônicas em seus hospedeiros, e o espectro clínico da infecção varia desde assintomático a fatal, dependendo parcialmente da suscetibilidade do hospedeiro (BERENT et al., 1998; MESSICK et al., 2000).

Até a década passada, eram classificados como organismos riquetsiais, baseado no seu tamanho diminuto, propriedades Gram negativas, parasitismo de eritrócitos e possível transmissão através de artrópodes hematófagos (KREIER; RISTIC, 1984), sendo considerados dos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales. Todavia, com o desenvolvimento de técnicas moleculares e mediante a análise filogenética de sequências do gene 16S rRNA, essas bactérias foram reclassificadas como sendo do gênero *Mycoplasma*, classe Mollicutes (NEIMARK; KOCAN, 1997). O gene 16S rRNA de alguns destes organismos (*Eperithrozoon suis*, *Eperythrozoon wenyonii*, *Haemobartonella felis* e *Haemobartonella muris*) foi sequenciado e analisado filogeneticamente (RIKIHISA et al., 1997). Mais tarde, baseado em suas características fenotípicas, como o tamanho dos organismos e do seu genoma, a ausência de parede celular e flagelos, resistência à penicilina e a suscetibilidade a tetraciclina, os gêneros *Haemmobartonella* e *Eperythrozoon* foram reclassificados dentro do gênero *Mycoplasma* como micoplasmas hemotrópicos (NEIMARK et al., 2001), e a utilização provisória da designação *Candidatus* proposta para novas espécies (NEIMARK et al., 2002a).

A categoria *Candidatus* é recomendada para procariotos incultiváveis cujas características estruturais, metabólicas e reprodutivas não estejam completamente elucidadas, sendo conhecido pouco de sua biologia além de sua informação genômica

(MURRAY; STACKEBRANDT, 1995). Tal designação foi proposta para micoplasmas hemotrópicos como o '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', por exemplo, primeiramente descrito em gatos (FOLEY; PEDERSEN, 2001).

Muitas espécies de hemoplasmas receberam nomenclatura de acordo com o hospedeiro em que foram identificados, pois se acreditava numa alta especificidade de infecção. Contudo, a gama de hospedeiros da maioria das espécies não foi totalmente investigada (NEIMARK et al., 2001), e há evidências de que um mesmo hemoplasma possa infectar diferentes espécies de hospedeiro. O *Mycoplasma ovis*, por exemplo, anteriormente denominado *Eperythrozoon ovis*, comumente descrito em ovelhas, já foi encontrado em cabras (NEIMARK et al., 2004) e cervídeos (GRAZZIOTIN et al., 2011).

3.1 MORFOLOGIA

Os hemoplasmas podem ser visualizados ao microscópio óptico em esfregaços sanguíneos corados por corantes do tipo Romanowsky, como estruturas basofílicas, de forma cocóide, em bastão ou anel, encontrados individualmente, agrupados ou em cadeias ao longo da superfície dos eritrócitos (VENABLE; EWING, 1968; NEIMARK et al., 2001). Geralmente estão localizados em depressões e invaginações na membrana dos eritrócitos e aderidos a esta por delicadas fibrilas (TANAKA et al., 1965; AIKAWA; NUSSENZWEIG, 1972; PETERS et al., 1974; ZACHARY; BASGALL, 1985; DILLBERGER et al., 1994; NEIMARK; KOCAN, 1997; MESSICK et al., 2002; NEIMARK et al., 2002b; NEIMARK et al., 2004).

Sua morfologia e localização epieritrocítica também podem ser observadas por meio de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, onde é possível visualizar a ausência de parede celular e a presença de fibrilas entre a célula bacteriana e o eritrócito (NEIMARK et al., 2002b; NEIMARK et al., 2004).

3.2 DIAGNÓSTICO

Em esfregaços sanguíneos observados ao microscópio óptico, utilizando corantes do tipo Romanowsky, os hemoplasmas podem ser visualizados ao longo da

superfície dos eritrócitos (NEIMARK et al., 2001). Sabe-se que as técnicas moleculares são mais sensíveis do que a análise de esfregaços sanguíneos por microscopia (BERENT et al., 1998; FOLEY et al., 1998; WESTFALL et al., 2001), pois esta apresenta baixa sensibilidade (TASKER et al., 2010). Nesta técnica, os hemoplasmas são visualizados geralmente associados à membrana dos eritrócitos e frequentemente soltos no plasma, que pode ocorrer devido à presença do anticoagulante EDTA, que provoca sua dissociação da membrana (HARVEY; GASKIN, 1977). Por este motivo, a confecção de esfregaços sanguíneos deve ser realizada imediatamente após a coleta do sangue (SYKES, 2010a).

No caso de infecções crônicas, principalmente, em que números muito baixos ou indetectáveis de organismos podem estar presentes na amostra. Além disso, pela característica transitória da infecção no sangue e semelhança aos corpúsculos de Howell-Jolly, assim como com precipitados da coloração, a identificação dos hemoplasmas em esfregaços sanguíneos pode ser considerada uma técnica pouco confiável (BERENT et al., 1998). A identificação e diferenciação das diversas espécies de hemoplasmas somente por meio da microscopia óptica são difíceis, se não impossíveis, de serem realizadas (TASKER; LAPPIN, 2002). Ainda, a impossibilidade de cultura *in vitro* desses agentes limita a capacidade investigativa e diagnóstica dos hemoplasmas. Por este motivo, tamanha é a importância das técnicas moleculares para o diagnóstico (MESSICK, 2004).

O desenvolvimento de ensaios moleculares específicos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), mais sensíveis e capazes de diferenciar entre várias espécies de hemoplasmas permitiu um diagnóstico mais preciso das infecções por hemoplasmas. Além disso, aprimorou os estudos de epidemiologia e patogênese desses organismos (WILLI et al., 2007a), e permitiu a identificação de várias espécies novas de micoplasmas hemotrópicos (TASKER et al., 2010a). Tais técnicas se baseiam, em sua maioria, na detecção do gene 16S rRNA do hemoplasma no sangue da espécie infectada, no qual também pode ser utilizado material seco de esfregaços sanguíneos, apesar de menos sensível. A coleta de sangue para a realização da PCR deve ser realizada antes da administração de antibióticos para evitar resultados falsamente negativos (SYKES, 2010b).

Recentemente, estão sendo desenvolvidas técnicas de PCR convencional (MESSICK et al., 1998; JENSEN et al., 2001; ZHANG; RIKIHISA, 2002; SANTOS et

al., 2009) e PCR quantitativo para diferentes espécies de hospedeiros (BARKER et al., 2010; NISHIZAWA et al., 2010) altamente sensíveis e específicas que permitem detecção e quantificação da infecção por hemoplasmas (GUIMARÃES et al., 2011a).

Um método rápido, preciso e confiável para determinação da infecção e percentual de eritrócitos parasitados foi desenvolvido por meio da técnica de citometria de fluxo (SÁNCHEZ-PÉREZ et al., 2013). O sistema utiliza um corante específico para ácidos nucleicos e promete ser um método de diagnóstico mais rápido e menos laborioso do que as técnicas moleculares aplicadas hoje em dia, já que não necessita de grandes volumes de sangue e dispensa a etapa de extração. Contudo, tal técnica ainda não está prontamente disponível e/ou comercializada.

Até o momento, não há testes sorológicos de rotina para o diagnóstico de infecções por hemoplasmas. O desenvolvimento de tais ensaios é significativamente dificultado, pois hemoplasmas não podem ser cultivados *in vitro*, e, portanto, antígenos precisam produzidos por infecção experimental. A identificação e aplicação de antígenos recombinantes vem sendo estudada (WOLF-JÄCKEL et al., 2010, MESSICK; SANTOS, 2011), mas nenhum ensaio sorológico diagnóstico foi produzido e disponibilizado comercialmente.

3.3 PATOGENIA

Micoplasmas hemotrópicos são agentes causais de anemia infecciosa em uma variedade de espécies de mamíferos (WILLI et al., 2007b). A infecção varia de assintomática a grave, com risco de óbito, e o desenvolvimento da doença aguda ou crônica depende parcialmente da suscetibilidade do animal, da espécie de micoplasma envolvida, da rota de infecção e dose do inóculo (MESSICK, 2004; TASKER et al., 2009).

Os micoplasmas hemotrópicos não são encontrados livres na natureza, e dependem de uma célula hospedeira para adquirirem nutrientes essenciais que não são capazes de produzir, como aminoácidos, ácidos graxos, colesterol e vitaminas (MESSICK, 2004). Para isso a bactéria se adere aos eritrócitos, formando depressões na superfície capazes de provocar dano à membrana celular (WILLI et al., 2007a). A infecção pode, portanto, levar a hemólise extravascular, principalmente esplênica ou hepática, mas também podendo ocorrer nos pulmões e na medula óssea. Hemólise

intravascular também pode ocorrer devido a aumento na fragilidade osmótica dos eritrócitos parasitados (TASKER, 2010).

Há vários mecanismos propostos para explicar os processos patológicos da infecção por micoplasmas hemotrópicos. O desenvolvimento de anemia pode ocorrer devido ao dano direto ao eritrócito, como a produção bacteriana de radicais livres e o sequestro de nutrientes ou precursores biossintéticos do eritrócito parasitado. (TASKER et al., 2009). Além disso, mecanismos imunomediados podem estar envolvidos, como a produção de autoanticorpos contra antígenos expressos pelos eritrócitos, devido à ligação da bactéria à membrana da célula hospedeira, desencadeando uma desordem imunológica (ZULTY; KOCIBA, 1990; ALLEMAN et al., 1999; MESSICK, 2004; SYKES, 2010).

A impossibilidade do cultivo de micoplasmas hemotrópicos representa uma grande dificuldade em se estudar os processos patológicos envolvidos na infecção e realizar estudos *in vitro* que forneçam um melhor entendimento das características biológicas, e os mecanismos patogênicos e imunogênicos dos hemoplasmas. Técnicas moleculares fornecem uma visão sobre sua diversidade filogenética e epidemiológica, mas pouco contribuem para a compreensão da fisiologia desses microrganismos, mecanismo de infecção e resposta imune do hospedeiro (HOELZLE, 2008).

Os mecanismos patogênicos dos hemoplasmas ainda não estão completamente elucidados. Uma vez que essas bactérias não são cultiváveis *in vitro*, a dose a ser utilizada em infecções experimentais não pode ser mensurada precisamente, interferindo nos resultados (BIONDO et al., 2009). A sobrevivência e adaptação dos hemoplasmas ao hospedeiro se devem ao parasitismo da superfície celular dos eritrócitos e sua dependência da célula hospedeira para o fornecimento de nutrientes, o que, acredita-se, diminua a vida útil da célula parasitada. A inabilidade em cultivar esses organismos em laboratório se dá provavelmente pela incapacidade de reproduzir o suporte nutricional complexo necessário fornecido pelo hospedeiro (MESSICK, 2004).

O metabolismo dos carboidratos também parece estar marcadamente alterado nos eritrócitos parasitados (SUTTON, 1976) e a utilização de glicose pelo próprio microrganismo pode estar associada à patogenia da doença, uma vez que a parasitemia é inversamente proporcional à concentração de glicose no plasma de ovinos infectados por *M. ovis* (MCLAUGHLING et al., 1990, BURKARD; GARRY,

2004). A infecção por *M. suis* também é capaz de induzir morte celular programada em eritrócitos parasitados e esta está relacionada com a severidade da anemia nos suínos infectados (FELDER et al., 2011).

A predisposição à infecção aguda é influenciada pela idade do hospedeiro, doenças concomitantes, imunossupressão e estresse. Animais esplenectomizados também demonstram maior tendência à doença (NEIMARK et al., 2001). Em gatos, a hemoplasmose aguda está associada à parasitemia massiva dos eritrócitos, causando grave anemia hemolítica, algumas vezes fatal. Ocorre redução brusca do hematócrito e os sinais clínicos incluem palidez, letargia, fraqueza, taquicardia, taquipneia, esplenomegalia, linfadenopatia e ocasionalmente icterícia (WILLI et al., 2007a). A infecção concomitante pelos hemoplasmas *M. haemofelis* e '*C M. haemominutum*' em felinos, induz a anemia mais severa (MORAIS et al., 2007), e há indícios de que linhagens diferentes de uma mesma espécie de hemoplasmas possam desencadear processos patológicos de intensidades distintas (REYNOLDS; LAPPIN, 2007).

Em cães, a infecção pode causar anemia grave, geralmente em animais esplenectomizados, imunossuprimidos ou com infecções concomitantes (NEIMARK et al., 2001; MESSICK, 2003), mas também ocorre em animais não esplenectomizados (NORTH, 1978; AUSTERMAN, 1979). Estes apresentam sinais clínicos como anorexia, letargia, perda de peso e febre e em casos graves pode levar o animal a óbito (MESSICK, 2003). Em suínos, a infecção causa pirexia, anorexia, depressão e doença hemolítica aguda (HOELZLE, 2007).

Em animais cronicamente infectados a doença clínica pode ocorrer de forma oculta ou pouco definida. Infecções crônicas ocorrem tipicamente em animais aparentemente saudáveis, imunocompetentes que não tenham sido esplenectomizados (MESSICK, 2004).

Ovinos demonstram baixo ganho de peso, anemia grave e até mesmo mortalidade de cordeiros e, ocasionalmente, ovinos jovens (TAGAWA et al., 2011, HAMPEL et al., 2014), enquanto que camelídeos apresentam anemia, hipoglicemia e sinais clínicos que incluem colapso agudo, perda de peso, depressão e letargia (MCLAUGHLIN et al., 1990, TORNIQUIST et al., 2002). Diferentes espécies de hemoplasmas podem apresentar diferentes processos patológicos mesmo que no mesmo hospedeiro. Em bovinos, por exemplo, alterações hematológicas como diminuição da contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e aumento no

volume corpuscular médio puderam ser observados em animais infectados pelo 'C M. haemobos' quando comparados com animais infectados pelo *M. wenyonii* ou não infectados (TAGAWA et al., 2010, HOELZLE et al., 2011).

Em hospedeiros saudáveis, a hemoplasmosose raramente é fatal, causando infecções crônicas com uma diversidade de sinais clínicos (NEIMARK et al., 2001). Gatos que apresentam infecção crônica por hemoplasmas associada a infecções retrovirais podem desenvolver doença mieloproliferativa ou transformação neoplásica de células hematopoiéticas. Em cães pode ocorrer anemia leve, leucopenia e apatia (MESSICK, 2003). Em suínos, a baixa reprodutividade, morte embrionária, abortos, assim como perda de peso e maior incidência de infecções respiratórias e entéricas são associadas com infecção crônica por hemoplasma. Bovinos podem apresentar redução na produção de leite, perda de peso e baixas taxas reprodutivas (TAGAWA et al., 2013), enquanto que ovinos apresentam anemia leve, perda de peso, diminuição na produção de lã e intolerância a exercícios (NEIMARK et al., 2004). Animais podem ser portadores crônicos por meses a anos, mesmo após tratamento com antibióticos (WILLI et al., 2007b).

Animais infectados naturalmente podem apresentar letargia e piroxia no momento em que hemoplasmas podem ser visualizados nos esfregaços sanguíneos. Porém, é difícil identificar se tais sinais clínicos são devido à infecção ou outro processo patológico não diagnosticado (TASKER et al., 2001). A dinâmica da fase crônica da infecção por hemoplasmas ainda é pouco compreendida. Hipotetiza-se que animais cronicamente infectados possam ser capazes de reativar a infecção sob condições especiais, como imunossupressão e, posteriormente, representarem uma fonte de infecção para outros animais. Felinos portadores crônicos do 'C M. turicensis', por exemplo, mantêm organismos detectáveis por PCR em alguns tecidos durante vários meses após a infecção e altos títulos de anticorpos por tempo indeterminado. Entretanto, terapia imunossupressora não foi capaz de reativar a infecção pelo 'C M. turicensis' (NOVACCO et al., 2011).

3.4 TRANSMISSÃO

O modo de transmissão dos micoplasmas hemotrópicos há muito vem sendo estudado (BARTLETT; PEASE, 1975) e ainda não foi completamente elucidado.

Sabe-se que são transmitidos por vetores hematófagos, sendo esta a forma proposta como natural de transmissão, mas também já foi observada a transmissão direta, descrita entre gatos, e a transmissão entre espécies (WILLI et al., 2007a).

Artrópodes hematófagos tem sido propostos como meios naturais de transmissão de hemoplasmas, e piolhos da espécie *Polyplax serrata* são transmissores de hemoplasmas em camundongos (BERKENKAMP; WESCOTT, 1988). Carrapatos só foram PCR positivos para hemoplasmas felinos quando retirados diretamente dos animais e não retirados da vegetação (HORNOK et al. 2010), o que sugere que esta espécie não seja um reservatório importante para hemoplasmas (WILLI et al., 2007a). Outros vetores implicados na transmissão da hemoplasmose incluem os piolhos da espécie *Polyplax spinulosa*, pulgas das espécies *Ctenocephalides felis* e *Xenosylla cheopis* e carrapatos como *Ixodes ricinus*, *Ixodes ovatus* e *Rhipicephalus* sp. (MESSICK, 2004; WILLI et al., 2007a; HOELZLE, 2008; HORNOK et al., 2010; SYKES, 2010b, TASKER, 2010). Certas espécies de moscas (*Stomoxys calcitrans*) e mosquitos (*Aedes aegypti*) também parecem estar envolvidas na transmissão de hemoplasmas (PRULLAGE et al., 1993). A provável transmissão via vetores artrópodes ainda é reforçada pelo fato de que a prevalência da infecção varia em locais com diferentes graus de infestação por artrópodes (SYKES et al., 2007) ou onde as temperaturas médias anuais são mais elevadas (WILLI et al., 2007a). Contudo, a infecção por micoplasmas hemotrópicos também é prevalente em regiões onde a ocorrência de artrópodes hematófagos é incomum, devendo haver outros meios de transmissão envolvidos (WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010c, TASKER, 2010).

Willi et al. (2007c) foram capazes de demonstrar a presença de 'C M. turicensis' na saliva e fezes de gatos infectados experimentalmente, fornecendo evidências de que a transmissão direta em casos de interação agressiva e mordeduras seja possível. O DNA do 'C M. haemominutum', de forma similar, foi detectado na saliva e glândulas salivares de gatos infectados (DEAN et al., 2008). Portanto, animais de vida livre estão em maior risco de infecção por hemoplasmas, já que são mais expostos aos artrópodes hematófagos e exibem maior atividade de luta do que animais domésticos ou não domésticos, mas mantidos em cativeiro (WILLI et al., 2007b). Todavia, estudos relacionados à transmissão de micoplasmas hemotrópicos são escassos e na maioria inconclusivos (BIONDO et al., 2009).

Experimentalmente, a hemoplasmosose pode ser propagada por inoculação via subcutânea, intravenosa, intraperitoneal e oral de sangue contaminado por hemoplasmas (WILLI et al., 2007a; HOELZLE, 2008; TASKER, 2010). Já foram descritos casos de contágio através de transfusão sanguínea (WILLI et al., 2006b; WILLI et al., 2007a) e por transmissão vertical, durante a gestação, parto ou por meio da lactação (WILLI et al., 2007a; HOELZLE, 2008; HU et al., 2009; TASKER, 2010). A detecção da infecção em uma alpaca de apenas quatro dias de idade, e sem a presença de ectoparasitas reforça a teoria da transmissão intrauterina (ALMY et al., 2006). Além disso, existe a possibilidade de contaminação de animais durante vacinação, aplicação de brincos de identificação e outros procedimentos nos quais ocorra contato com sangue infectado (MESSICK, 2004), ou ainda por instrumentos ou equipamentos médicos sem adequada esterilização (TASKER, 2010).

Obara *et al.* (2011) foram capazes de detectar a presença de '*C. M. haemominutum*' em dois filhotes de cães de apenas três meses, sugerindo uma possível rota de transmissão vertical nesse caso. Em 1982, Owen descreveu um surto de infecção em uma colônia de ratos de um hospital e investigou a possibilidade de transmissão transplacentária. Todas as fêmeas adultas apresentaram parasitas em esfregaços sanguíneos sete dias após esplenectomia, enquanto que seus filhotes permaneceram sem alterações pelas duas semanas em que foram monitorados. Todos os filhotes sucumbiram à infecção depois de inoculados intraperitonealmente com sangue de animal infectado, e os microrganismos apareceram nos esfregaços sanguíneos entre 5 e 6 dias após a infecção (OWEN, 1982).

Estudos experimentais indicam que o contato social com gatos infectados não apresenta risco importante de infecção. No entanto, a transmissão direta via interações agressivas, como mordeduras, pode ocorrer se o animal for exposto a um pequeno volume de sangue infeccioso (MUSEUX et al., 2009). A presença de hemoplasmas filogeneticamente semelhantes em diferentes espécies de hospedeiros sugere possível transmissão interespecífica, e nesse caso alguns animais podem desenvolver a doença enquanto outros atuam apenas como transmissores (WILLI et al., 2007a).

3.5 TRATAMENTO

O tratamento de escolha para hemoplasmose é a antibioticoterapia com doxiciclina, por no mínimo duas semanas e transfusão de sangue, quando anemia grave ocorrer. Em cães, a doxiciclina foi capaz de eliminar a infecção por *M. haemocanis* em um animal que se manteve negativo em testes por PCR quantitativo por até oito meses após o tratamento (PITORRI et al., 2012), enquanto que oxitetraciclina ou enrofloxacin foram ineficazes em diminuir o número de cópias de *M. haemocanis*, apesar de produzir algum nível de melhora clínica (HULME-MOIR et al., 2012).

A azitromicina não se mostrou efetiva no tratamento de gatos infectados com *M. haemofelis* (WESTFALL et al., 2001). Outras drogas antimicrobianas que já foram testadas e, aparentemente, reduzem a parasitemia e os sinais clínicos da infecção em gatos, provavelmente não são capazes de eliminar por completo os organismos do hospedeiro (FOLEY et al., 1998; BERENT et al., 1998), como é o caso da marbofloxacin (ISHAK et al., 2008). Gatos infectados experimentalmente tratados com doxiciclina tem uma aparente resposta clínica, mas os organismos ainda podem ser detectados através de PCR quando os mesmos gatos recebem imunossupressores, como o acetato de metilprednisolona (BERENT et al., 1998). A oxitetraciclina foi utilizada com sucesso em quatro casos de infecção por *M. haemofelis* relatados por Kurtde e Ural (2004). Porém, o monitoramento da infecção foi realizado apenas através de microscopia neste caso, não garantindo a eliminação do parasita. De maneira similar, a pradofloxacin foi capaz de eliminar a infecção experimental por *M. haemofelis* em quatro gatos, que se mantiveram negativos por PCR quantitativo por até um mês depois do uso de terapia imunossupressora (DOWERS et al., 2009).

Em gatos domésticos, o tratamento é indicado somente para animais com sinais clínicos e alterações hematológicas. Para animais positivos por PCR, mas assintomáticos, não se recomenda o tratamento já que este não necessariamente elimina a bactéria do organismo do hospedeiro. Consequentemente, não há tratamento que possa ser utilizado preventivamente em potenciais doadores de sangue (SYKES, 2010c).

Em seres humanos, o tratamento com doxiciclina também se mostrou eficaz seis meses após associação com moxifloxacin. Os resultados de PCR quantitativa,

realizada para monitoramento da resposta ao tratamento, foram negativos (STEER et al., 2011).

Em alguns primatas esplenectomizados para estudos experimentais, a terapia com oxitetraciclina é utilizada para prevenir a possível infecção espontânea com hemoplasmas. Contudo, Michel *et al.*, (2000) demonstraram a falha em prevenir a ocorrência da infecção nos animais tratados com esse antibiótico. Os autores consideraram a neoarsfenamina como uma boa alternativa na cura da hemoplasmosse em macacos (MICHEL et al., 2000).

3.6 OCORRÊNCIA

Micoplasmas em geral são amplamente distribuídos no reino animal e virtualmente todo mamífero, ave, réptil, anfíbio e peixe pode sofrer infecção por alguma de suas espécies. Enquanto a maioria parece apresentar especificidade de hospedeiro, infecções por micoplasmas em hospedeiros diferentes do seu natural já foram descritas (PITCHER; NICHOLAS, 2005).

Infecções por micoplasmas hemotrópicos, por outro lado, ocorrem tipicamente em animais, e já foram descritas em diversas espécies de mamíferos incluindo caninos, felinos, bovinos, suínos, ovinos, primatas, entre outros (SANTOS et al., 2008; GUIMARÃES, 2008; GUIMARÃES et al., 2007; TAGAWA et al., 2008; TAGAWA et al., 2011, MAGGI et al., 2013a, 2013b). Infecções por micoplasmas hemotrópicos são tipicamente específicas de cada espécie hospedeira ou espécies estreitamente próximas (NEIMARK; KOCAN, 1997). Contudo, muitos trabalhos tem demonstrado que a gama de hospedeiros possíveis é maior do que se pensava (NEIMARK et al., 2001).

Dentre os animais de companhia, infecções por *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' já foram identificadas em gatos domésticos (WILLI et al., 2007b; SYKES, 2010a, 2010b, SANTOS, 2008). Estas espécies também foram encontradas em felídeos neotropicais de vida livre e de cativeiro (GUIMARÃES, 2008). Outra espécie, denominada '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*'-like (SYKES et al., 2007) também já foi descrita em felinos.

Em cães, duas espécies são conhecidas, *Mycoplasma haemocanis* e '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*' (KENNY et al., 2004; SYKES et al., 2005). A espécie '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', comumente encontrada em gatos, também tem sido relatada infectando cães (ZHUANG et al., 2009; OBARA et al., 2011).

Mycoplasma suis, *Mycoplasma wenyonii*, *Mycoplasma haemomuris*, *Mycoplasma coccoides*, '*Candidatus Mycoplasma haemolamae*', '*Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis*', '*Candidatus Mycoplasma haemozalophi*', '*Candidatus Mycoplasma kahanei*' e '*Candidatus Mycoplasma aoti*' foram identificados em suínos, bovinos, roedores, camundongos, alpacas, gambás, leão-marinho, macaco-de-cheiro e macaco-da-noite, respectivamente (NEIMARK; KOCAN, 1997, RIKIHISA et al., 1997; NEIMARK et al., 2001, 2002b; MESSICK et al., 2002; NEIMARK et al., 2004; NEIMARK et al., 2005; HOELZLE, 2008; VOLOKHOV et al., 2011; BARKER et al., 2011). O *Mycoplasma ovis* foi detectado primeiramente em ovinos, mas também já foi encontrado em caprinos e cervídeos (NEIMARK et al., 2001, 2002b; NEIMARK et al., 2004; GRAZZIOTIN et al., 2011).

As espécies citadas acima são alguns exemplos da grande variedade destes microrganismos. Algumas espécies de hospedeiro e os respectivos hemoplasmas descritos infectando-os estão resumidos na **Tabela 1**. Novas espécies estão constantemente sendo descritas e a possibilidade de infecção de diferentes hospedeiros por um mesmo hemoplasma também já foi identificada.

Nos últimos anos, novas espécies de micoplasmas hemotrópicos foram descritas como responsáveis por infecções em uma grande variedade de hospedeiros animais. São alguns deles: renas (STOFFREGEN et al., 2006), macacos-coruja (BARKER et al., 2011b), bovinos (TAGAWA et al., 2008, GIROTTO et al., 2012), equinos (DIECKMANN et al., 2012), capivaras (VIEIRA et al., 2009), leões-marinhos (VOLOKHOV et al., 2011), ursos negros asiáticos (ISO et al., 2012), gatos-de-iriomote (HIRATA et al., 2012), raposas (CABELLO et al., 2013), guepardos (KRENGEL et al., 2013), bugios-pretos (SANTOS et al. 2013) ratazanas de esgoto (SASHIDA et al., 2013), entre outros.

TABELA 1. RELAÇÃO DE ALGUMAS ESPÉCIES INFECTADAS POR MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS. Relação de algumas espécies animais onde a infecção por micoplasmas hemotrópicos já foi relatada, as espécies da bactéria encontradas e referências.

HOSPEDEIRO	HEMOPLASMA	REFERÊNCIA
Alpacas e lhamas	' <i>Candidatus Mycoplasma haemolamae</i> '	MCLAUGHLIN <i>et al.</i> , 1990, MESSICK <i>et al.</i> , 2002.
Bovinos	<i>Mycoplasma wenyonni</i> , ' <i>Candidatus M. haemobos</i> ', <i>Eperythrozoon teganodes</i> , <i>E. tuomii</i>	MELI <i>et al.</i> , 2010; ANZIANI <i>et al.</i> , 1982; UILENBERG, 1967; TAGAWA <i>et al.</i> , 2008, GIOTTO <i>et al.</i> , 2012.
Camundongos, ratazanas e ratos	<i>M. coccoides</i> , <i>M. haemomuris</i>	BIDWELL e VOLLER, 1967; BARTLETT e PEASE, 1975; SASHIDA <i>et al.</i> , 2013.
Canídeos	<i>M. haemocanis</i> e ' <i>Candidatus M. haematoparvum</i> '	SYKES <i>et al.</i> , 2005; ROURA <i>et al.</i> , 2010.
Capivaras	<i>Mycoplasma</i> spp	VIEIRA <i>et al.</i> , 2009
Caprinos e ovinos	<i>M. ovis</i> , ' <i>Candidatus Mycoplasma haemovis</i> '	NEIMARK <i>et al.</i> , 2004; MASON <i>et al.</i> , 1989.
Cervídeos	<i>M. ovis</i> , <i>Candidatus M. erythroceruae</i> , ' <i>Candidatus M. haemocervae</i> '	STOFFREGEN <i>et al.</i> , 2006; BOES <i>et al.</i> , não publicado
Felídeos	<i>M. haemofelis</i> , <i>Candidatus M. haemominutum</i> , <i>Candidatus M. turicensis</i>	WILLI <i>et al.</i> , 2007; FOLEY; PEDERSEN, 2001; SANTOS <i>et al.</i> , 2009.
Gambás	' <i>Candidatus M. haemodidelphidis</i> '	MESSICK <i>et al.</i> , 2000.
Guaxinins	<i>Haemobartonella procyoni</i>	FRERICHS e HOLBROOK, 1971.
Leões-marinhos	' <i>Candidatus M. haemozalophi</i> '	VOLOKHOV <i>et al.</i> , 2011.
Macacos	' <i>Candidatus M. kahanei</i> '	NEIMARK <i>et al.</i> , 2002a; BARKER <i>et al.</i> , 2011.
Mangusto	Ira-nian <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> -like hemoplasma	SHARIFIYAZDI <i>et al.</i> , 2014
Morcegos	<i>E. mariboi</i>	EWERS, 1971; MASCARELLI <i>et al.</i> , 2014.
Raposa	<i>M. haemocanis</i>	SASAKI <i>et al.</i> , 2008
Suínos	<i>M. suis</i> , <i>E. parvum</i>	YUAN <i>et al.</i> , 2009; HOELZLE <i>et al.</i> , 2010; UILENBERG <i>et al.</i> , 1981.
Texugos		HARASAWA <i>et al.</i> , 2014
Ursos		ISO <i>et al.</i> , 2012

3.7 HEMOPLASMAS EM ROEDORES

O *Mycoplasma coccoides*, antigo *Eperythrozoon coccoides*, que ocorre naturalmente em algumas linhagens de camundongos, foi descrito primeiramente em 1928 por Schilling (SCHILLING, 1928). Naquela época, alguns experimentos foram capazes de demonstrar a transmissão do organismo de hospedeiros naturais para camundongos não infectados facilmente através da inoculação intraperitoneal de sangue infectado. A detecção do *M. coccoides* em hospedeiros e a sua transmissão

eram favorecidas pela esplenectomia (MARMOSTON, 1935). Pouco tempo depois, a transmissão deste hemoplasma pelo piolho *Polyplax serrata* já era investigada e considerada uma rota viável (ELIOT, 1936).

Em 1982, Iralu e Ganong detectaram a presença da infecção por *M. coccoides* na sua colônia de camundongos de laboratório. A presença do hemoplasma produzia aglutinação dos eritrócitos dos roedores, e os autores propuseram a utilização do sistema desenvolvido como um excelente modelo para o estudo de adesão bacteriana.

Weinman (1944), sobre a infecção por *M. coccoides*, descreveu um aumento na policromatofilia como única constante hematológica encontrada, e aponta a necessidade de se avaliar a influência da esplenectomia neste evento isolado. Outros autores não observaram alterações hematológicas (SCHILLING, 1928; BRUYNOGHE; VASSILIADIS, 1929), e Dinger (1929) relatou contagens normais de eritrócitos em camundongos infectados, mas observou uma eosinofilia inicial. Eliot e Ford (1930) descreveram um aumento na policromatofilia, e atribuíram esta a um discreto aumento na hemólise.

Nos roedores infectados, ao quarto dia após a esplenectomia os organismos eram facilmente visualizados em esfregaços sanguíneos corados pelo método de Giemsa. Apareciam como discos azuis-púrpura, anéis (medindo de 0,5 a 1,0 micrômetros em diâmetro) com centros não corados, e diminutas formas cocóides. Os microrganismos eram comumente encontrados aderidos aos eritrócitos, com particular afinidade pelos reticulócitos policromáticos, mas também presentes no plasma. Camundongos infectados natural ou experimentalmente geralmente não apresentavam sinais clínicos e os achados patológicos de necropsia se resumiam a aumento e congestão do parênquima esplênico (FORD; MURRAY, 1959).

O *M. coccoides* é implicado no desenvolvimento de anemia hemolítica crônica em camundongos e, apesar de inicialmente abundante no sangue, a parasitemia diminui consideravelmente em número quando a anemia se torna inicialmente evidente. Frequentemente as infecções maciças por *M. coccoides* são desencadeadas por esplenectomia, mas a infecção concomitante com outros microrganismos também provoca ativação de infecções latentes de *M. coccoides* e a anemia causada pela bactéria se torna, provavelmente, um fator complicador não reconhecido (THURSTON, 1954).

Em ratazanas, o *M. haemomuris* (antigo *Haemobartonella muris*) é o micoplasma hemotrópico mais comumente encontrado. Em estudos preliminares, pesquisadores relatavam um aumento no número de organismos no sangue por 3 a 4 dias e uma súbita diminuição, de maneira similar ao comportamento do *M. coccoides*. Ocorria uma diminuição drástica da contagem de eritrócitos, e sinais de regeneração da linhagem eritrocítica caso houvesse recuperação do camundongo (ADLER, 1930). Hemoglobinúria era raramente encontrada em camundongos, enquanto que ocorria frequentemente em ratazanas. Além disso, o sangue coletado de ratazanas no pico da infecção apresentava maior coagulabilidade e hemoglobinemia era comum (ADLER, 1930).

O *M. haemomuris* não possui genes do espaçador tRNA e apresenta loci boxA e boxB, características comuns do genoma dos micoplasmas. Esses achados moleculares corroboram a classificação do *M. haemomuris* como membro do gênero *Mycoplasma* (HARASAWA, et al., 2002). Assim como ocorre com outros hemoplasmas (BARKER et al., 2011b; WATANABE, et al., 2011; SASAOKA et al., 2012), dois grupos genéticos distintos de *M. haemomuris* foram demonstradas por análise das estruturas primárias e secundárias da região ITS (16S-23S rDNA) de linhagens deste hemoplasma (SASHIDA et al, 2013b). Isto pode fornecer uma pista para elucidar diferenças na gravidade da anemia em roedores, uma vez que a virulência destes dois grupos é atualmente desconhecida.

Infecções por micoplasmas hemotrópicos já foram descritas em uma variedade de roedores selvagens e de laboratório, incluindo camundongos, ratos e hamsters, como agentes infecciosos causadores de anemia e esplenomegalia nesses animais (RIKIHISA et al., 1997; NEIMARK et al., 2001; ZHANG; RIKIHISA, 2002; NEIMARK et al., 2005). Contudo, a prevalência de infecções por hemoplasmas em roedores de vida livre ainda não foi documentada, com exceção do estudo de Willi *et al.* (2007c), que descobriu que 53% das amostras de sangue de camundongos *Apodemus* de vida livre na Suíça eram positivas por PCR para *M. coccoides*.

A infecção por *M. coccoides*, capaz de causar anemia hemolítica branda em roedores de laboratório e de vida livre, já foi descrito no Brasil (ANDRADE et al., 1986). Entretanto, até o presente momento, nenhum outro trabalho tratou de estudar a ocorrência, epidemiologia e caracterização clínica e molecular desta espécie no país. Recentemente, foi detectada a presença de um novo hemoplasma em capivaras

brasileiras. Dois isolados foram encontrados e os autores especulam se tratar de duas linhagens de uma mesma espécie (VIEIRA et al., 2009).

Em 2013, Sashida *et al.* (2013), identificaram a presença de uma nova espécie de hemoplasma cuja sequência do gene 16S rRNA era 87% homóloga a do *M. haemomuris*, em um espécime de ratazana de esgoto (*Rattus norvegicus*) dentre nove capturadas durante uma ação sanitária em um hospital veterinário. Apesar do pequeno número de animais amostrados, a frequência encontrada (12,5%) sugere que a ocorrência de hemoplasmas nestes roedores seja comum.

Além destes, apesar de micoplasmas clássicos, incluindo ureaplasmas, terem sido demonstradas em texugos, infecções por micoplasmas hemotrópicos nunca haviam sido descritas nestes animais até o relato de uma nova espécie recentemente encontrada no Japão (HARASAWA et al., 2014). Contudo, e de forma geral, a gama de hospedeiros, modo de transmissão, e as características antigênicas e moleculares destes organismos são amplamente desconhecidos (ZHANG; RIKIHISA, 2002).

3.8 POTENCIAL ZOONÓTICO

Grande parte dos membros do gênero *Mycoplasma* comumente coloniza e infecta seres humanos, enquanto que micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) infectam principalmente animais (MESSICK, 2004). A transmissão entre espécies destes agentes vem sendo investigada devido à estreita relação filogenética entre os hemoplasmas de diferentes hospedeiros. Em um estudo foi demonstrada a capacidade do hemoplasma felino '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' de infectar cães no Japão (OBARA et al., 2011). É provável que algumas condições subjacentes como imaturidade ou imunossupressão possam destruir a especificidade estrita de hospedeiro das infecções por hemoplasmas (OBARA et al., 2011). Outros membros da classe Mollicutes, também considerados parasitas espécie-específicos, já foram descritos infectando humanos, como é o caso do *M. pulmonis* (FERREIRA et al., 2008), parasita do trato respiratório de roedores. Tais relatos corroboram a teoria de que alguns desses organismos possam ultrapassar a barreira de especificidade e apresentar potencial zoonótico.

O potencial zoonótico desta bactéria torna-se evidente uma vez que algumas espécies de hemoplasmas originalmente encontradas em animais já foram descritas

infectando seres humanos. Duas populações humanas em risco de infecção zoonótica por hemoplasmas são reconhecidas: imunocomprometidos e superexpostos. Santos *et al.* (2008b) descreveram a coinfeção por *Mycoplasma haemofelis*-like e *Bartonella henselae* em um paciente HIV-positivo. De forma similar, no estado do Texas, nos Estados Unidos, o caso de um médico veterinário imunossuprimido coinfectado com *B. henselae* e *Mycoplasma ovis* foi relatado (SYKES *et al.*, 2010b).

Muitos profissionais veterinários são expostos diariamente no seu ambiente profissional a um espectro de animais domésticos, de produção e selvagens, que podem estar persistentemente infectados com bactérias, protozoários e vírus. Além do contato com animais infectados, fluídos e tecidos biológicos durante exames clínicos e de necropsia, veterinários são frequentemente expostos a vetores artrópodes, como pulgas, piolhos e carrapatos, que podem infestar animais saudáveis, doentes ou mortos (MAGGI *et al.*, 2013c).

Yuan *et al.* (2009) descreveram infecções em humanos pelo hemoplasma suíno *Mycoplasma suis* em 49% de uma população de trabalhadores e veterinários em propriedades de produção suína em Shanghai. Esta alta prevalência pode ser atribuída ao contato direto e indireto com os animais infectados (YANG *et al.*, 2000).

Um trabalho realizado na China relatou alta prevalência de infecções humanas naquele país, principalmente entre gestantes e recém-nascidos de mães positivas para hemoplasmas (HU *et al.*, 2009). Chu *et al.* (2009) analisaram retrospectivamente os dados e estudos publicados na China entre 1994 e 2007 e constataram um número alarmante de humanos infectados por micoplasmas hemotrópicos em algumas regiões. Um estudo epidemiológico sobre a prevalência de *M. suis* mostrou grande semelhança filogenética entre linhagens encontradas em suínos, veterinários e outros funcionários que trabalhavam com os animais, sugerindo uma possível transmissão interespécies (CONGBIN *et al.*, 2010).

Apesar das infecções por hemoplasmas em humanos descritas, os sinais clínicos da doença, metodologia de diagnóstico e identificação da espécie infectante nem sempre estão disponíveis (DUARTE *et al.*, 1992; YUAN *et al.*, 2007; STEER *et al.*, 2011), dificultando a interpretação desses estudos. Além disso, a correlação de hemoplasmas comumente encontrados em animais e descritos em humanos com sinais clínicos e processo patológico também é difícil, pois estes casos geralmente apresentarem coinfeção (SANTOS *et al.*, 2008b; SYKES *et al.*, 2010b) ou por não haver informação clínica disponível (YUAN *et al.*, 2009). Ainda, poucos são os relatos

de hemoplasmose em humanos, já que os sinais clínicos são semelhantes aos de outras patologias e podem ser confundidos com outras doenças (CONGBIN et al., 2010).

Humanos podem ser assintomáticos ou apresentar variadas alterações clínicas como febre aguda, anemia e icterícia, principalmente em neonatos (HU et al., 2009). Em infecções latentes o paciente usualmente não apresenta sinais clínicos, com exceção de alguns indivíduos que apresentam letargia. O quadro agudo resulta em anemia hemolítica imunomediada, icterícia e febre contínua. Em relação aos parâmetros laboratoriais, pode ocorrer redução da hemoglobina, aumento da bilirrubina total e indireta e reticulocitose (CONGBIN et al., 2010). Recentemente foi descrito um caso de hemoplasmose em uma paciente com neutropenia crônica, hemólise aguda e febre, causado por nova espécie denominada '*Candidatus Mycoplasma haemohominis*' (STEER et al., 2011). O tratamento com doxiciclina parece ser igualmente eficaz no tratamento de infecções por hemoplasmas em humanos (STEER et al., 2011) como em animais.

Existe uma possível relação da infecção por micoplasmas com doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide e doenças reumáticas, além da provável atuação como cofator em infecções retrovirais como a AIDS (MESSICK, 2004). Em 1992, pesquisadores brasileiros observaram micoplasmas em seis pacientes anêmicos com AIDS (DUARTE et al., 1992) e mais recentemente, foram relatados dois casos em pacientes com HIV (SANTOS et al., 2008b; TASKER et al., 2010).

Relatos esporádicos descrevem organismos com semelhanças morfológicas a hemoplasmas no sangue de pacientes humanos (MAGGI et al., 2013c; STEER et al., 2011). O relato de coinfeção com '*C. M. haematoparvum*' e outros dois organismos (*A. platys* e *B. henselae*) transmitidos por carrapato em um mesmo paciente humano, representa uma observação importante (MAGGI et al., 2013c). Apesar de atualmente haver mínima evidência que apoie um papel patogênico importante para espécies de micoplasma hemotrópicos em cães ou seres humanos (SYKES et al., 2010), a presença de coinfeção com outros microrganismos pode significar um processo patológico significativo. Além disso, alguns autores especulam que outras espécies de hospedeiro possam servir de reservatório para algumas espécies de hemoplasmas (OBARA et al., 2011), mesmo que sem o desenvolvimento de sinais clínicos.

A infecção por hemoplasmas deve ser considerada como um diagnóstico diferencial em pacientes humanos com anemia hemolítica e pirexia. Testes moleculares para identificação de hemoplasmas devem ser incluídos na investigação de tais pacientes, para permitir a detecção rápida desta infecção, que pode ser mais comum do que se considerava anteriormente (STEER et al., 2011). As alterações em condições que favorecem surtos de doenças por diminuir a resistência do hospedeiro e facilitar a transmissão, aliadas a evolução progressiva e seleções de variantes de micoplasmas, sugerem que espécies novas ou não reconhecidas previamente causadas por esses organismos possam emergir, ou doenças antigas, supostamente extintas, possam reaparecer (ROSENGARTEN et al., 2001).

Médicos veterinários e técnicos, devido à sua profissão, estão expostos a vetores artrópodes e ao contato diário com os hospedeiros reservatórios com bacteremia persistente, incluindo gatos e cães, hospedeiros de *B. henselae* e *A. platys*, respectivamente, assim como micoplasmas hemotrópicos (MAGGI et al., 2013c). Devido esse contato frequente com carrapatos e pulgas, e a animais que abrigam patógenos transmitidos por vetores intravasculares por meses ou anos, tais profissionais devem usar medidas de proteção individual, como luvas, lavar as mãos e contenção ideal para evitar mordidas e arranhões. Além disso, produtos de pulverização e ação rápida devem ser utilizados rotineiramente para eliminar pulgas e carrapatos em animais examinados em necropsias ou atendidos por profissionais veterinários. Mais importante, médicos responsáveis pelo tratamento de profissionais veterinários devem estar cientes dos riscos zoonóticos ocupacionais inerentes às atividades diárias de profissionais da saúde animal.

3.9 IMPORTÂNCIA EM PESQUISA

Por mais avançada que a ciência que utiliza animais de laboratório possa ser, ela está sujeita a doenças infecciosas dos animais experimentais, que podem prejudicar a validade de muitos experimentos. Infecções clinicamente silenciosas são particularmente importantes e complicadas já que muitas vezes passam despercebidas até que a sua presença seja anunciada por alterações inesperadas em dados experimentais (BAKER et al., 1971). A hemoplasmosse é exemplo disso devido a sua sutileza extrema e profunda influência sobre uma grande variedade de estudos.

Estudos antigos sobre hepatite em camundongos sofreram influência da disseminada infecção por *M. coccoides* nos animais de laboratório. Muitos camundongos morriam prematuramente e o estudo de infecções combinadas se tornava difícil. Naquela época, não havia indicação de que as manifestações patológicas da hepatite nos camundongos fossem influenciadas pela presença do hemoplasma no sangue, uma vez que os animais frequentemente apresentavam esplenomegalia e congestão esplênica (NELSON, 1953).

Em diversos destes estudos foi observado que infecções latentes por hemoplasmas podem ser ativadas quando outro agente infeccioso atua no corpo do hospedeiro. Dessa maneira, uma reação sinérgica resulta da associação do *M. coccoides* com vírus, bactérias e protozoários (NELSON, 1953). Até a detecção do *M. coccoides* em colônias de camundongos de laboratório e a tomada de estratégias de eliminação deste microrganismo das mesmas, é possível especular que muitas pesquisas científicas e estudos com agentes infecciosos tenham sofrido interferência da infecção combinada de hemoplasmas com o agente estudado (IRALU et al., 1982), comprometendo os resultados e, conseqüentemente, a interpretação dos dados obtidos nesses estudos. O mesmo foi proposto para o hemoplasma comumente encontrado em ratos, *M. haemomuris* (anteriormente *Haemobartonella muris*). Em 1982, Owen especulava que, por menor que seja o dano causado aos eritrócitos nos animais intactos (não esplenectomizados) infectados, a presença latente do parasita pode ter um efeito marcante sobre resultados experimentais.

A infecção enzoótica por *M. coccoides* era sabidamente comum em populações de camundongos de laboratório. Os animais infectados raramente apresentavam sinais clínicos e a infecção era negligenciada. Com o desenvolvimento de novos estudos e a determinação da relação da presença do hemoplasma com outros processos patológicos, incluindo tumores (NELSON, 1956), o *M. coccoides* passou a ser considerado como um fator significativo nos estudos envolvendo o uso de camundongos e as atenções se voltaram para a sua detecção em colônias de laboratório. Não apenas a infecção silenciosa, mas a transmissão acidental dessas infecções resultantes da passagem *in vivo* de sangue total, plasma ou outro material biológico carregado de sangue contribuía significativamente para a perpetuação do problema (BAKER et al., 1971).

As implicações mais importantes, no entanto, estão relacionadas com a distribuição ubíqua de hemoplasmas em colônias de animais experimentais,

combinadas com a capacidade deste organismo de afetar a resistência do hospedeiro e produção de interferon, por exemplo (GLASGOW et al., 1971). Se uma infecção latente por hemoplasmas pode ser ativada por meio de esplenectomia ou superinfecção, então irradiação, drogas imunossupressoras, soros anti-linfocíticos, timectomia, e outras técnicas que alterem a resistência do hospedeiro poderiam, de maneira similar, desencadear uma infecção oculta (MARMORSTON, 1935, BERGER; LINKENHEIMER, 1962, GLEDHILL et al., 1965, GLASGOW et al., 1971). Este potencial levanta a importante questão da possibilidade de que a exacerbação de uma infecção oculta por *M. coccoides* em estudos concebidos para determinar o efeito destas várias técnicas ou procedimentos sobre resposta antigênica (LJUNGSTRÖM et al., 1974), resistência do hospedeiro a infecções por vírus subsequentes, ou capacidade de produção de interferon pelo hospedeiro (GLASGOW et al., 1974). Alguns estudos chegaram a propor uma suscetibilidade 100 vezes maior a endotoxinas bacterianas por camundongos na fase de alta parasitemia por *M. coccoides* (GLEDHILL; NIVEN, 1957).

Devido à frequência com que as infecções por micoplasmas hemotrópicos aconteciam em roedores de laboratório no passado, pesquisadores entendiam que quaisquer respostas de hospedeiro a infecções experimentais por protozoários, em especial malária (HSU; GEIMAN, 1952; OTT; STAUBER, 1967; MOLYNEUX et al., 1970) ou babesiose, deviam imediatamente levantar a suspeita e a investigação pela infecção por hemoplasmas nos animais utilizados (PETERS, 1965).

Relatos na literatura sobre a eliminação de hemoplasmas em colônias de roedores de laboratório existem (GLEDHILL et al., 1965). Porém, esses trabalhos datam de épocas anteriores ao desenvolvimento de técnicas moleculares de diagnóstico e se baseiam praticamente na eliminação de vetores artrópodes. Interessantemente, apesar de técnicas para a eliminação de patógenos em colônias de roedores experimentais serem relatadas (ARTWOHL et al., 2008; AMSTISLAVSKY et al., 2013), não foram encontrados na literatura descrições atuais de técnicas e/ou protocolos que garantissem especificamente a ausência de infecção por micoplasmas hemotrópicos em animais de laboratório.

A infecção de cães de laboratório pelo hemoplasma *M. haemocanis* foi pouco reconhecida e considerada de baixa relevância na pesquisa. Contudo, um caso de epidemia por *M. haemocanis* em um laboratório europeu complicou um grande estudo experimental e culminou na finalização prematura de um projeto de pesquisa. Os

pesquisadores temiam que a infecção fosse um fator de confusão na análise dos resultados experimentais (KEMMING et al., 2004a). Além disso, um trabalho prospectivo com canis da Europa e da América do Norte identificou a infecção por *M. haemocanis* em todos os canis investigados (KEMMING et al., 2004b).

De forma similar, muitos macacos esplenectomizados utilizados como hospedeiros experimentais em estudos sobre malária, especialmente no desenvolvimento de vacinas para proteção contra os estágios sanguíneos do *Plasmodium falciparum*, são portadores assintomáticos de micoplasmas hemotrópicos (MICHEL et al., 2000). A infecção latente, ativada pela esplenectomia, pode interferir no curso da parasitemia do *P. falciparum* nesses animais (CONTAMIN; MICHEL, 1999).

Grupos de pesquisa que utilizem animais precisam estabelecer vigilância eficaz e demonstrar de forma conclusiva a ausência de infecção com *M. haemocanis* para assegurar a validade de resultados científicos. Uma proposta para reduzir a prevalência de *M. haemocanis* em um laboratório de pesquisa deve incluir a erradicação repetida de vetores em potencial, como o carrapato do cão *R. sanguineus*, alojamentos isolados, coletas de sangue frequentes e avaliação de esfregaços sanguíneos. Técnicas moleculares de diagnóstico são especialmente recomendadas. Alguns autores consideram atualmente que a realização de estudos experimentais em animais esplenectomizados ou potencialmente imunossuprimidos é, em geral, não recomendada (KEMMING et al., 2004).

3.10 DETERMINAÇÃO DE GENOMAS COMPLETOS

Alguns grupos de pesquisa internacionais tem tratado de determinar a sequência completa do genoma de alguns micoplasmas hemotrópicos afim de melhor estudá-los e entender seu metabolismo e mecanismos de adaptação ao hospedeiro. Essa estratégia tem em suas justificativas a inabilidade até o momento em se cultivar com sucesso os hemoplasmas em laboratório. Nos últimos anos, apesar da ausência de cultivo *in vitro*, os genomas de nove espécies de micoplasmas hemotrópicos foram sequenciados (BARKER et al., 2011a; GUIMARÃES et al., 2011b; OEHLERKING et al., 2011; SANTOS et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2012; BARKER et al., 2012;

MESSICK et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2012; SANTOS et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2012, NASCIMENTO et al., 2013; DESHUIILLERS, et al., 2014).

Como os menores organismos autorreplicantes descritos, os micoplasmas hemotrópicos apresentam uma extensa redução do seu genoma, resultando num metabolismo conciso com enzimas multifuncionais, baixa redundância genômica e regulação complexa. No entanto, apesar do minimalismo genético, estes organismos são capazes de sobreviver nos hospedeiros por longos períodos de tempo, muitas vezes escapando das respostas imunes e estabelecendo infecções crônicas (GUIMARÃES et al., 2014).

O primeiro genoma completo de um membro dos hemoplasmas foi descrito em 2011 por Barker *et al.* a partir de um gato infectado experimentalmente com *M. haemofelis*. O conhecimento e análise do genoma completo dos hemoplasmas fornecem informações valiosas a respeito de porque este patógeno permanece altamente exigente, bem como a identificação de potenciais proteínas imunogênicas, fatores de patogenicidade, possíveis mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro (BARKER et al., 2011) e fornece bases para uma melhor compreensão do metabolismo destes organismos, especialmente suas necessidades nutricionais, que têm impedido a cultura *in vitro* até agora (OEHLERKING et al., 2011). Tais análises permitiram, inclusive, a descoberta de que os hemoplasmas responsáveis pela infecção em ovinos, *M. ovis* e '*C. M. haemovis*', possam ser, na verdade, o mesmo microrganismo com duas cópias do gene 16S rRNA em seu genoma (DESHUIILLERS, et al., 2014).

Como o estudo *in vitro* dos hemoplasmas ainda é muito limitado, a partir do genoma dessas bactérias, tem se estudado seu metabolismo na tentativa de determinar e prever rotas metabólicas com o uso de técnicas computacionais. A maior parte da pesquisa publicada hoje em relação ao metabolismo de micoplasmas hemotrópicos foi realizada com as espécies *M. suis* e *M. haemofelis*. Os estudos sobre a reconstrução das vias metabólicas de hemoplasmas são de suma importância e objetivam o desenvolvimento de técnicas de cultivo *in vitro* para essas bactérias (HOELZLE, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido para análise da Comissão de Ética para Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias (CEUA/SCA) da Universidade Federal do Paraná – UFPR e aprovado sob o número de protocolo 057/2013 (**Anexo**).

4.1 CAPTURA E COLETA DE AMOSTRAS

Foram utilizadas ratazanas (*Rattus norvegicus*) de vida livre capturadas no Passeio Público e Zoológico de Curitiba, e ratazanas provenientes de biotério convencional e mantidas no criatório do Passeio Público para serem utilizadas na alimentação dos animais carnívoros do acervo do parque. As ratazanas de vida livre foram capturadas em armadilhas do tipo Tomahawk® (45 cm x 16 cm x 16 cm), vivas e iscadas com frutas, cereais e/ou ração. As armadilhas foram dispostas em locais onde a presença de roedores havia sido previamente detectada, e retiradas pela manhã do dia seguinte. As armadilhas com animais capturados foram manuseadas sempre com o uso de luvas de couro e equipamentos de segurança pessoal (jaleco e máscara). Todas as capturas e coletas ocorreram entre os meses de Julho de 2013 e Janeiro de 2014.

As coletas de sangue foram realizadas no ambulatório veterinário do Passeio Público, onde as armadilhas foram colocadas em recipiente hermeticamente fechado e os animais anestesiados por inalação com isoflurano. Depois de anestesiados os animais foram pesados e a coleta do sangue realizada. Foram coletadas amostras de sangue total em tubos a vácuo de 8,5mL com ativador de coágulo e de 4mL contendo EDTA K₂ (BD®, Becton & Dickinson, EUA) através de punção intracardíaca (**Figura 1**). Terminado o procedimento, os animais foram eutanasiados por administração intracardíaca de cloreto de potássio.



FIGURA 1. COLETA DE SANGUE POR PUNÇÃO INTRACARDÍACA. Coleta de amostras de sangue total em tubos a vácuo de 8,5 mL com ativador de coágulo e de 4 mL contendo EDTA K₂ (BD®, Becton & Dickinson, EUA) através de punção intracardíaca em ratazana anestesiada por inalação com Isoflurano.

Durante a amostragem, informações relativas ao sexo e local de captura foram recolhidas. Como não se conhecia o tamanho total da população a ser estudada, e considerando uma proporção esperada da população infectada de 12,5% (SASHIDA et al., 2013), um Intervalo de confiança de 95% e um erro máximo de 10%, estimou-se um N mínimo de 43 animais necessários para a realização da pesquisa. No total, foram capturadas e amostradas 23 ratazanas de vida livre do Passeio Público e 20 do Zoológico de Curitiba. Outras 20 ratazanas, provenientes de biotério convencional e mantidas no criatório do Passeio Público, foram amostradas como controle interno da qualidade sanitária dos animais utilizados na alimentação dos carnívoros do acervo. Além disso, as análises laboratoriais geradas nesta pesquisa servirão como dados epidemiológicos basais e auxiliarão na determinação de diretrizes para melhoria na qualidade da sanidade dos animais ali alocados, utilizados como alimento dos carnívoros do acervo.

4.2 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

A partir das amostras com anticoagulante EDTA K₂ foram determinados o hematócrito (HT), por meio da técnica de microhematócrito, e a concentração de proteína plasmática total (PPT), por refratometria. Ambas as técnicas realizadas no Laboratório de Zoonoses e Epidemiologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Também a partir das amostras de sangue total com EDTA K₂ esfregaços sanguíneos foram confeccionados imediatamente (e no máximo em cinco minutos) após a coleta e posteriormente corados por meio de coloração do tipo Romanowsky (May-Grünwald – Giemsa) de forma automatizada (Sysmex XE-2100), garantindo qualidade constante das colorações. As lâminas com os esfregaços sanguíneos corados foram escaneadas também de forma automatizada com a utilização de uma plataforma de escaneamento de lâminas Metafer (MetaSystems®) no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Fluorescência Convencional e Confocal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. As imagens obtidas foram observadas para pesquisa de hemoplasmas e posterior comparação com o resultado das análises moleculares. Para cada lâmina foram contadas 1000 células (eritrócitos) em diferentes campos, escolhidos aleatoriamente, e anotado o número de estruturas compatíveis com hemoplasmas associadas à superfície celular dos eritrócitos para obtenção de uma média das mesmas por célula.

4.3 ANÁLISES SOROLÓGICAS

Os tubos com ativador de coágulo foram centrifugados para obtenção do soro que foi armazenado a -80°C para posterior realização de análises sorológicas para detecção de anticorpos para cinco patógenos conhecidos zoonóticos: *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp, *Neospora caninum*, *Leptospira* spp e *Trypanosoma cruzi*. Estas análises acontecerão simultaneamente às análises moleculares e serão realizadas em parceria com o NUPEZO – Núcleo de Pesquisa em Zoonoses – UNESP/Botucatu. Os resultados obtidos nessas análises farão parte de um trabalho paralelo a ser publicado no futuro.

4.4 ANÁLISES MOLECULARES

Alíquotas de sangue total anticoagulado com EDTA K₂ foram armazenadas a -80°C até que os procedimentos moleculares fossem realizados. A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Zoonoses e Epidemiologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

As amostras tiveram seu DNA extraído de 100 µL de sangue total com EDTA K₂ em duplicatas utilizando-se o kit comercial Quick-gDNA™ MiniPrep (Zymo Research, Corp., Orange, Califórnia, EUA) de acordo com as orientações do fabricante. Para cada 10 extrações das amostras de sangue um controle negativo (água ultrapura) foi incluído para garantir que não houvesse contaminação cruzada. As amostras de DNA extraído foram armazenadas a -80°C até o envio para o Laboratório de Hemoplasmas do Departamento de Patobiologia Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária na Universidade de Purdue, Indiana, EUA, onde foram mantidas a -20°C até a realização das análises moleculares.

A fim de verificar a qualidade da extração de DNA, as amostras foram analisadas para a presença de ácidos nucleicos por espectrofotometria (NanoDrop 2000c, ThermoScientific Inc., Wilmington, Delaware, EUA), e tais resultados foram utilizados para a escolha da melhor duplicata (a com maior concentração de DNA) a ser utilizada nas determinações moleculares. Além disso, reações de PCR convencional para o gene constitutivo da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram realizadas como descrito anteriormente (BIRKENHEUER et al., 2003), para garantir a presença de DNA amplificável nas amostras.

4.4.1 PCR Convencional para o gene GAPDH

Para confirmar a presença de DNA amplificável e a ausência de inibidores da PCR nas amostras extraídas, foi realizada a amplificação de um fragmento de aproximadamente 400 pb do gene que codifica a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). O gene da GAPDH faz parte do DNA nuclear do hospedeiro e é rotineiramente utilizado para a confirmação da presença de DNA em estudos moleculares. Uma amostra de água ultrapura foi utilizada como controle negativo da reação.

Para a reação de PCR convencional foram utilizados *primers* previamente descritos (BIRKENHEUER et al., 2003). Tais sequências de *primers* foram alinhadas com a sequência do gene da GAPDH murina com utilização da ferramenta BLASTn para garantir a eficiência na amplificação, apresentando 100% de identidade com a mesma (**Figura 2**).

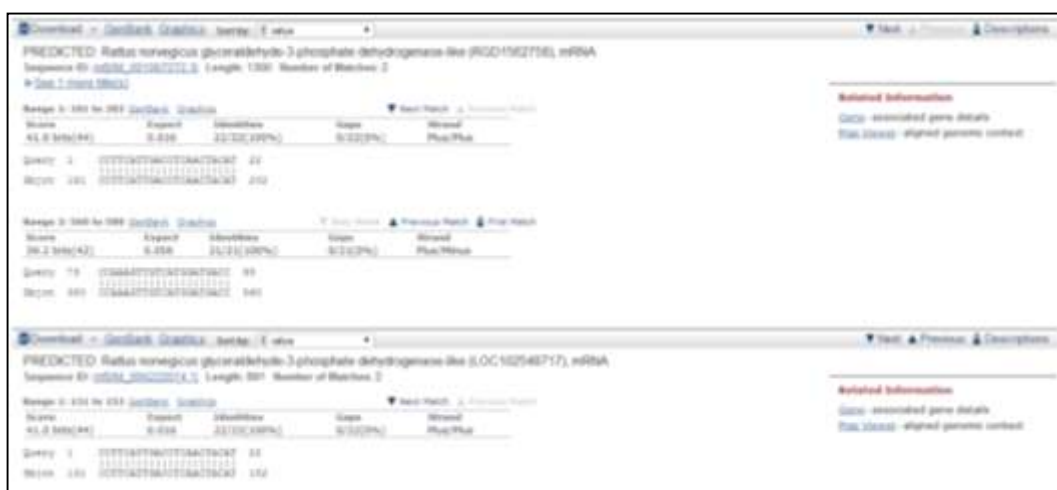


FIGURA 2. ALINHAMENTO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA GAPDH E COMPARAÇÃO COM O GENOMA MURINO. Confirmação de que os *primers* previamente descritos para amplificação do gene da GAPDH apresentam 100% de identidade com o gene da GAPDH murino.

O protocolo de reação de PCR convencional foi realizado em um termociclador (iCycler® Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories Inc., Life Science Group, Hercules, Califórnia, EUA) e consistiu de 15,875 µL de água livre de RNase, 2,5 µL (1X) de tampão, 0,5 µL de dNTPs (200 µM), 0,125 µL (1,25 unidade) de Taq DNA Polymerase (M0273S, NewEngland BioLabs® Inc., Ipswich, Massachusetts, EUA), 0,5 µL (0,2 µM) de *primer forward*, 0,5 µL (0,2 µM) de *primer reverse* e 5 µL de amostra, totalizando 25 µL de reação. Cada reação do PCR convencional consistiu de 30 segundos de desnaturação a 95°C seguidos por 34 ciclos de amplificação (30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de anelamento a 55°C e 30 segundos de extensão a 68°C) e um ciclo de extensão final de 5 minutos a 68°C seguido de resfriamento a 4°C.

Os produtos obtidos na PCR, assim como um marcador de peso molecular 100 bp, Plus DNA Ladder (Fermentas®, Glen Burnie, Maryland, EUA) foram aplicados em gel de agarose a 1,5% e separados por eletroforese horizontal usando TAE 1X como

tampão de corrida durante o período de 1 hora à 100V, 3,0A e 300W. Subsequentemente o gel foi corado em solução de brometo de etídio sob agitação suave durante 30 minutos. Os géis foram expostos à luz UV na faixa de 312 nm em transiluminador para a revelação dos fragmentos separados do produto de PCR e comparação dos tamanhos entre estes fragmentos e marcador de peso molecular. O gel foi fotografado usando o sistema de imagens G:BOX Chemi XR5 (GBCXR50313, SYNGENE®, Frederick, Maryland, EUA).

A definição de resultados positivos e negativos baseou-se na visualização das bandas no gel de agarose fotografado de tamanho de aproximadamente 400 pb para o produto amplificado do gene da GAPDH.

4.4.2 Triagem Universal para Hemoplasmas

A técnica de PCR baseada no princípio de SYBR® Green (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA) (PCR quantitativo) para a detecção universal de hemoplasmas foi utilizada como uma triagem inicial de amostras positivas (Willi et al., 2009). Esse método combina as vantagens da PCR convencional e quantitativa, e permite a quantificação com menor restrição do que as técnicas em que sondas (ou *probe*) são utilizadas, como TaqMan® PCR.

A reação foi realizada em um aparelho automatizado de PCR em tempo-real (Applied Biosystems® 7300 Real-Time PCR System, Foster City, Califórnia, EUA) e consistiu de 12,5 µL de SYBR® Green (SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA), 0,75 µL (0,3 µM) de *primer forward*, 0,75 µL (0,3 µM) de *primer reverse* (os dois *primers* reversos foram utilizados como uma mistura 1:1 para a reação de PCR SYBR® Green), 6,0 µL de água livre de RNase e 5 µL de amostra, totalizando numa reação de 25 µL de acordo com o protocolo estabelecido por Willi et al. (2009).

O protocolo de SYBR® Green foi composto de 50°C durante dois minutos e 95°C durante 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante um minuto. Após a corrida de PCR, a dissociação foi realizada com o seguinte perfil térmico: 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 20 segundos, um aumento de 60°C a 95°C durante 20 minutos, e finalmente 95°C durante 15 segundos.

Água ultra pura livre de RNase e amostra de DNA extraído de camundongo sabidamente não infectado por micoplasmas foram utilizadas como controle negativo

das reações. Como controle positivo foram utilizadas amostras sabidamente positivas para *Mycoplasma haemomuris* (gentilmente cedido pela Dra. Yasuko Rikihisa, Ohio State University) e positiva para um micoplasma hemotrópico encontrado em capivaras (VIEIRA et al., 2009).

Cada amostra foi analisada em duplicata e os resultados considerado positivos quando ambas cruzavam o limiar de detecção (C_T). Amostras cujo C_T encontrava-se acima de 34 ciclos foram reamplificadas através de PCR convencional para confirmação da positividade. Tal parâmetro foi criado com base nos resultados obtidos por Willi *et al.* (2009), autores do protocolo utilizado, que relataram a obtenção de produtos amplificados inespecíficos entre os C_{Ts} 34,4 e 39,9 para a técnica descrita.

4.4.2.1 Reamplificação de Amostras Suspeitas

Para confirmação da infecção por hemoplasmas, todas as amostras cujo C_T foi superior a 34 ciclos na triagem pela técnica de SYBR® Green foram reamplificadas através da técnica de PCR convencional. Os mesmos *primers* descritos por Willi *et al.* (2009) foram utilizados para tal e a reação consistiu de de 15,875 µL de água livre de RNase, 2,5 µL de tampão (1X), 0,5 µL (200 µM) de dNTPs, 0,125 µL (1,25 unidades) de Taq DNA Polymerase (M0273S, NewEngland BioLabs® Inc., Ipswich, MA, EUA), 0,5 µL (0,2 µM) de *primer forward* (SYBR_For), 0,5 µL (0,2 µM) de *primer reverse* (SYBR_Rev1 e SYBR_Rev2 em uma mistura de proporção 1:1) e 5 µL de amostra, totalizando 25 µL de reação. O protocolo de reação foi executado em um termociclador (iCycler® Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories Inc., Life Science Group, Hercules, Califórnia, EUA) e consistiu de 30 segundos de desnaturação a 95°C seguidos por 40 ciclos de amplificação (30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de anelamento a 56°C e 30 segundos de extensão a 68°C) e um ciclo de extensão final de 5 minutos a 68°C, seguido de resfriamento a 4°C.

Os produtos obtidos na PCR, assim como um marcador de peso molecular 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas®, Glen Burnie, Maryland, EUA) foram aplicados em gel de agarose 1,5% e separados por eletroforese horizontal usando TAE 1X como tampão de corrida durante o período de 1 hora à 100V, 3,0A e 300W. O gel foi corado em solução de brometo de etídio sob agitação por 30 minutos. Os géis foram expostos à luz UV na faixa de 312 nm em transiluminador para a revelação dos fragmentos separados do produto de PCR e comparação dos tamanhos entre estes fragmentos e

marcador de peso molecular. O gel foi fotografado usando o sistema de imagens Epi Chem II Darkroom com a Roper Scientific Camera (UVP, Inc., Upland, Califórnia, EUA).

A definição de resultados positivos e negativos baseou-se na visualização das bandas no gel de agarose fotografado de tamanho de aproximadamente 140 pb para o produto amplificado do DNA do gene 16S rRNA de micoplasmas hemotrópicos.

4.4.3 Triagem para Hemoplasmas de Roedores

As amostras positivas na triagem universal para hemoplasmas foram submetidas à reação de PCR convencional a fim de se obter produtos de amplificação para sequenciamento e posterior comparação com sequências depositadas no GenBank®. As amostras positivas no PCR Quantitativo SYBR® Green foram divididas de acordo com as temperaturas de desnaturação (temperatura de *melting* - T_M) obtidas e uma amostragem mínima de 50% para cada uma delas foi selecionada para sequenciamento. No total, 28 amostras foram amplificadas por PCR convencional e um fragmento de aproximadamente 600 pb de cada submetido a sequenciamento.

4.4.3.1. Desenho de *Primers*

As sequências disponíveis no GenBank® de seis espécies de hemoplasmas previamente descritas em roedores foram alinhadas utilizando-se o software Genomatix (Genomatix® Software v.3.1 - <http://www.genomatix.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl>) para a escolha de regiões conservadas do gene 16S do RNA ribossomal a serem utilizadas para o desenho de *primers* específicos. As sequências utilizadas foram as de hemoplasmas descritos em capivaras por Vieira *et al.* (2009) (números de acesso FJ667773.1 e FJ667774.1), em ratazanas de esgoto por Sashida *et al.* (2013) (número de acesso AB752303), e em texugos por Harasawa *et al.* (2014) (número de acesso AB848713). Além destas, as sequências dos hemoplasmas comumente encontrados em roedores, *Mycoplasma haemomuris* descrita por Kawamori *et al.* (1997) (número de acesso U82963) e *Mycoplasma coccoides* descrita por Neimark *et al.* (2005) (número de acesso AY171918), também foram utilizadas. Oito regiões conservadas foram encontradas e duas (A e D) escolhidas para o desenho de *primers* capazes de gerar um produto de amplificação de

aproximadamente 600 pb, tamanho ideal para a obtenção de bons resultados de sequenciamento (**Tabela 2**).

TABELA 2. REGIÕES CONSSERVADAS ENTRE DIFERENTES ESPÉCIES DE HEMOPLASMAS. Regiões com 100% de identidade entre seis diferentes espécies de micoplasmas hemotrópicos descritas em infecções em roedores.

	REGIÃO	TAMANHO (PB)
A	311 – 337	27
B	506 – 528	23
C	783 – 817	35
D	888 – 940	53
E	942 – 958	17
F	1051 – 1067	17
G	1308 – 1340	33
H	1364 – 1387	24

Os *primers* RodHem F1 (5'-GGG ATT GAG ATA CGG CCC AT-3') e RodHem R1 (5'-AGG TCC CCG TCA ATT CCT TT-3') foram desenhados utilizando o software Primer3 (KORESSAAR; REMM, 2007; UNTERGASSER et al., 2012 - <http://primer3.ut.ee/>) e tiveram suas características analisadas pelos programas IDT's Oligo Analyzer Tool (<https://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) e PCR Primer Stats (http://bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html). Todos os primers utilizados neste estudo foram comercialmente sintetizados pela empresa IDT® (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA) e estão descritos na **Tabela 3**.

4.4.3.2 Reação de PCR Convencional

A reação de PCR convencional foi constituída por 45 µL de PCR SuperMix (PCR SuperMix High Fidelity, Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), 1 µL (0,2 µM) de *primer forward* (RodHem F1), 1 µL (0,2 µM) de *primer reverse* (RodHem R1) e 5 µL de DNA da amostra, totalizando 52 µL de reação.

As condições de ciclagem consistiram em: 30 segundos de desnaturação a 94°C, seguidos por 35 ciclos de amplificação (30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 56°C e 30 segundos de extensão a 72°C), e um passo

de extensão final a 72°C por 5 minutos, seguido por resfriamento a 4°C (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc., Waltham, Massachusetts, EUA). Amostra positiva para *M. haemomuris* foi utilizada como controle positivo. Amostra negativa na triagem por SYBR® Green e água ultrapura foram utilizadas como controle negativo.

Os produtos obtidos na PCR, assim como um marcador de peso molecular 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas®, Glen Burnie, Maryland, EUA) foram aplicados em gel de agarose 1,5% e então separados por eletroforese horizontal usando TAE 1X como tampão de corrida durante uma hora à 100V, 3,0A e 300W. O gel foi posteriormente corado em solução de brometo de etídio sob suave agitação durante 30 minutos e exposto à luz UV na faixa de 312 nm em transiluminador para a visualização. O gel foi fotografado usando o sistema de imagens Epi Chem II Darkroom com a Roper Scientific Camera (UVP, Inc., Upland, Califórnia, EUA).

4.4.3.3 Purificação de Bandas no Gel

Os produtos amplificados das amostras submetidas a PCR convencional tiveram suas bandas no gel de agarose purificadas utilizando-se o kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN® Inc., CA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante e algumas modificações sugeridas pela equipe técnica do Purdue Genomics Core Facility, Universidade de Purdue, West Lafayette, IN, EUA. Os géis utilizados para separação das bandas com os produtos amplificados da PCR foram corridos em eletroforese em duplicatas em duas faixas separadas, posteriormente cortadas e apenas uma submetida à coloração por brometo de etídio. Esta, utilizada como guia para corte da banda paralela para que a mesma fosse purificada sem interferência do brometo de etídio. Além disso, a fase de aquecimento a 55°C para dissolução do gel foi realizada em temperatura ambiente. A eluição com o DNA purificado foi submetida a sequenciamento pela técnica de Sanger.

TABELA 3. RELAÇÃO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NESTE ESTUDO. Nome, sequência e referência dos *primers* utilizados e/ou desenhados e sintetizados para uso neste estudo.

PRIMER	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
GAPDH-F	CCTTCATTGACCTCAACTACAT	BIRKENHEUER et al., 2003.
GAPDH-R	CCAAAGTTGTCATGGATGACC	BIRKENHEUER et al., 2003.
SYBR_For	AGCAATRCCATGTGAACGATGAA	WILLI et al., 2009.
SYBR_Rev1	TGGCACATAGTTTGCTGTCACTT	WILLI et al., 2009.
SYBR_Rev2	GCTGGCACATAGTTAGCTGTCACT	WILLI et al., 2009.
RodHem F1	GGGATTGAGATACGGCCCAT	Este trabalho.
RodHem R1	AGGTCCCCGTCAATTCCTTT	Este trabalho.
RodHem1300 Fw1	GCGAACGGGTGAGTAATGAA	Este trabalho.
RodHem1300 Fw2	GCAAACGGGCGAGTAATACA	Este trabalho.
RodHem1300 Rv	TCATAGTTTGACGGGCGGT	Este trabalho.

4.4.3.4 Sequenciamento

Os amplicons de aproximadamente 600 pb, produtos da amplificação parcial do gene 16S rRNA das amostras positivas selecionadas foram diretamente sequenciados no sequenciador capilar automático ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) usando detector capilar de 96 poços e 50 centímetros de comprimento e o kit BigDye® Terminator v3.1 (LifeTechnologies®, EUA) em uma única direção com o *primer* RodHem R1 no Purdue Genomics Core Facility, West Lafayette, IN, EUA. As sequências obtidas foram conferidas quanto a sua qualidade por visualização dos cromatogramas no programa FinchTV viewer versão 1.4.0 (Geospiza Inc., Seattle, Washington, EUA). Posteriormente, as sequências foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank® através da ferramenta BLASTn.

4.4.4 Amplificação de um Amplicon de 1300 pb Para Sequenciamento

Duas amostras foram selecionadas para amplificação de um produto maior de aproximadamente 1300 pb utilizando-se PCR convencional.

4.4.4.1 Desenho de *primers*

As mesmas sequências utilizadas para o desenho dos primers RodHem F1 e RodHem R1 e contidas na **Tabela 2** foram novamente alinhadas para o desenho de *primers* capazes de amplificar uma região maior do DNA do gene para a região 16S

do RNA ribossomal de micoplasmas hemotrópicos de roedores. Duas regiões conservadas mais distantes entre si foram selecionadas a fim de produzir um amplicon de tamanho ideal (aproximadamente 1300 pb) para análise e construção de árvore filogenética. Desta vez, uma região com alguns diferentes nucleotídeos (**Figura 3**) teve que ser utilizada e, portanto, um conjunto de dois *primers forward* foram desenhados para serem utilizados em solução.

alignment position		91.....	101.....	111.....	121.....
SewerRats_SASHIDA201	44	AGCGGCGAAC	GGGTGAGTAA	TACATATCTA	ACATACtctg
JapaneseBADGER_HARAS	51	AGTGGCAAAC	GGGCGAGTAA	TACATATTTA	ACCTACatac
01BrazilianCapybara_	1	AGTGGCGAAC	GGGTGAGTAA	TGCATATTTA	ACATACCCCT
02BrazilianCapybara_	1	AGTGGCGAAC	GGGTGAGTAA	TGCATATTTA	ACATACCCCT
haemomuris_KAWAMORI1	30	AGCGGCGAAC	GGGTGAGTAA	TGAATACTTA	ACATACCCtcc
coccoides_NEIMARK200	45	AGTGGCGAAC	GGGTGAGTAA	TACATATTTA	ACATACCCCT
		*****	*****	*****	*****
		*****	*****	*****	*****
		*****	*****	*****	*****
		*****	*****	*****	*****

FIGURA 3. REGIÃO UTILIZADA PARA DESENHOS DE PRIMERS FORWARD. Região do gene 16S rRNA de sequência similar entre seis diferentes micoplasmas hemotrópicos descritos em roedores utilizada para o desenho de dois *primers forward* alinhadas com o software Genomatix® v3.1.

Os *primers* RodHem1300Fw1, RodHem1300Fw2 e RodHem1300Rv foram desenhados utilizando o software Primer3 (KORESSAAR; REMM, 2007; UNTERGASSER et al., 2012 - <http://primer3.ut.ee/>), tiveram suas características analisadas pelos programas IDT's Oligo Analyzer Tool (<https://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) e PCR Primer Stats (http://bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html), e foram comercialmente sintetizados pela empresa IDT® (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA).

4.4.4.2 Reação de PCR Convencional

A reação de PCR convencional foi constituída por 45 µL de PCR SuperMix (PCR SuperMix High Fidelity, Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), 1 µL (0,2 µM) de *primer forward* (RodHem1300Fw1 e RodHem1300Fw2 em uma mistura de proporção 1:1), 1 µL (0,2 µM) de *primer reverse* (RodHem1300Rv) e 5 µL de DNA da amostra, totalizando 52 µL de reação.

As condições de ciclagem consistiram em: 30 segundos de desnaturação a 94°C, seguidos por 35 ciclos de amplificação (30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 55,7°C e 90 segundos de extensão a 72°C), e um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos, seguido por resfriamento a 4°C (iCycler® Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories Inc., Life Science Group, Hercules, Califórnia, EUA). Amostra sabidamente positiva para *M. haemomuris* foi utilizada como controle positivo e água ultra pura utilizada como controle negativo.

Os produtos obtidos na PCR, assim como um marcador de peso molecular 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Glen Burnie, Maryland, EUA) foram aplicados em gel de agarose 1,5% submetidos a eletroforese como descrito anteriormente. O gel foi posteriormente corado em solução de brometo de etídio sob suave agitação durante 30 minutos e exposto à luz UV na faixa de 312 nm em transiluminador para a visualização.

4.4.4.3 Sequenciamento

Os amplicons de aproximadamente 1300 pb, produtos da amplificação parcial do gene 16S rRNA das duas amostras selecionadas foram purificados do gel de agarose a 1,5% como descrito anteriormente e diretamente sequenciados no sequenciador capilar automático ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA) usando detector capilar de 96 poços e 50 centímetros de comprimento e o kit BigDye® Terminator v3.1 (LifeTechnologies®, EUA) em ambas as direções com os primers RodHem1300Fw1, RodHem1300Fw2 e RodHem1300Rv no Purdue Genomics Core Facility, West Lafayette, IN, EUA. As sequências obtidas foram conferidas quanto a sua qualidade por visualização dos cromatogramas no programa FinchTV Viewer versão 1.4.0 (Geospiza Inc., Seattle, Washington, EUA) e comparadas com sequências submetidas ao GenBank® através da ferramenta BLASTn.

4.4.4.4. Números de Acessos das Sequências de Nucleotídeos

As sequências de nucleotídeos do novo hemoplasma e do isolado de *M. haemomuris* encontradas em ratazanas de vida livre foram submetidas ao banco de

dados do GenBank® sob os números de acesso KM203857 (Amostra R25 – New Isolate) e KM258432 (Amostra R37 – *M. haemomuris*).

4.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas dos hemoplasmas encontrados foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados do Genbank® (BENSON et al., 2013) e alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W2 (THOMPSON et al., 1994). O dendograma filogenético construído através do programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2007) por meio do método do agrupamento por vizinhança (Neighbor-Joining) (SAITOU; NEI, 1987) e as distâncias corrigidas pelo Kimura *two-parameter model* (KIMURA, 1980). Os dados foram reamostrados 1.000 vezes para geração de valores de *bootstrap*.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Quando aplicável, os dados obtidos em cada análise foram tabulados e submetidos à análise estatística, apresentando-se a estatística descritiva (média, mediana e desvio padrão) e realizando-se a comparação entre variáveis. Utilizou-se o teste do qui-quadrado para comparar o sexo, localização e infecção. A análise descritiva da variável (positivo/negativo para a infecção por hemoplasmas) coletada para cada grupo foi realizada. O teste Student *t* foi utilizado para variáveis de análise univariada, como HT, PPT, presença de estruturas nas células, e peso das ratazanas. A análise estatística para este trabalho foi gerada utilizando o software SAS (Direitos Autorais, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) e as análises consideradas significativas quando $p < 0,05$.

A Universidade de Purdue (West Lafayette, IN, EUA) foi escolhida para a realização do presente projeto devido ao histórico de parcerias entre as instituições, ao contato do aluno com pesquisadores e professores desta Faculdade e da atuação do Laboratório de Hemoplasmas, situado no VPRB (Veterinary Pathobiology

Research Building-VPRB), exclusivamente dedicado à pesquisa e de referência internacional no estudo de micoplasmas hemotrópicos.

5 RESULTADOS

As quarenta e três (43) amostras coletadas de ratazanas capturadas no Passeio Público (23) e Zoológico de Curitiba (20), e as amostras coletadas das ratazanas do criatório do Passeio Público (20) de Curitiba foram analisadas para hematócrito (HT) e proteína plasmática total (PPT). Os animais também tiveram seu peso corporal medido e sexo determinado no momento da coleta. O total de dados obtidos está descrito na **Tabela 4**.

TABELA 4. DADOS HEMATOLÓGICOS E CARACTERÍSTICAS DAS RATAZANAS AMOSTRADAS. Local e origem e/ou captura, hematócrito (HT %) e proteína plasmática total (PPT g/dL), peso (g) e sexo das ratazanas amostradas neste projeto.

AMOSTRA	PP/ZOO/Criatório	LOCAL	HT (%)	PPT (g/dL)	PESO (g)	SEXO
R01	Passeio Público	Viveiro Novo	41	6.2	300	F
R02	Passeio Público	Veterinária	36	8.2	350	M
R03	Passeio Público	Veterinária		8.0	320	F
R04	Passeio Público	Veterinária	28	8.4	450	F
R05	Passeio Público	Belém	41	5.6	105	M
R06	Passeio Público	Cozinha	34	5.4	155	F
R07	Passeio Público	Belém	37	7.6	50	M
R08	Passeio Público	Belém	42	6.0	130	F
R09	Passeio Público	Belém	40	5.8	115	F
R10	Zoológico	Chimpanzé	38	6.4	330	F
R11	Passeio Público	Viveiro Novo	36	7.2	110	F
R12	Passeio Público	Viveiro Novo	36	7.4	90	F
R13	Passeio Público	Viveiro Novo	35	6.4	55	M
R14	Passeio Público	Cozinha	42	5.6	150	M
R15	Zoológico	Antilopário	38	7.4	380	F
R16	Passeio Público	Viveiro de Ouro	42	8.0	210	F
R17	Passeio Público	Viveiro Novo	38	7.4	165	M
R18	Passeio Público	Viveiro Novo	39	8.4	135	M
R19	Passeio Público	Ilha dos Monos	33	7.0	295	F
R20	Passeio Público	Ilha dos Monos	43	7.2	335	M
R21	Passeio Público	Ilha dos Saguís	34	6.2	385	M
R22	Passeio Público	Ilha dos Saguís	37	7.4	285	F
R23	Passeio Público	Ilha dos Saguís	34	6.6	150	F
R24	Passeio Público	Ilha dos Monos	35	7.2	255	F
R25	Passeio Público	Ilha dos Saguís	40	6.8	310	M
R26	Zoológico	Chimpanzé	38	7.2	415	M
R27	Zoológico	Chimpanzé	31	7.0	490	M
R28	Zoológico	Polaco	41	6.8	380	F
R29	Zoológico	Chimpanzé	37	6.8	470	M
R30	Zoológico	Aoudads	33	5.8	360	F
R31	Zoológico	Polaco	33	5.0	65	M

TABELA 4. DADOS HEMATOLÓGICOS E CARACTERÍSTICAS DAS RATAZANAS AMOSTRADAS. Local e origem e/ou captura, hematórito (HT %) e proteína plasmática total (PPT g/dL), peso (g) e sexo das ratazanas amostradas neste projeto.

(Continuação e/ou conclusão)

AMOSTRA	PP/ZOO/Criatório	LOCAL	HT (%)	PPT (g/dL)	PESO (g)	SEXO
R32	Zoológico	Polaco	34	5.4	65	F
R33	Zoológico	Polaco	34	4.6	70	F
R34	Zoológico	Polaco	31	5.2	55	M
R35	Zoológico	Polaco	31	5.2	65	M
R36	Zoológico	Polaco	41	5.2	65	M
R37	Zoológico	Chimpanzé	39	6.4	380	M
R38	Zoológico	Chimpanzé	32	5.8	305	F
R39	Zoológico	Bisão	28	5.2	50	M
R40	Zoológico	Bisão	32	6.4	100	M
R41	Zoológico	Aoudads	35	6.8	290	F
R42	Zoológico	Aoudads	32	6.2	225	M
R43	Zoológico	Aoudads	37	5.4	70	F
R44	Criatório PP	Criatório PP	37	7.0	290	M
R45	Criatório PP	Criatório PP	36	6.8	280	M
R46	Criatório PP	Criatório PP	41	7.2	295	M
R47	Criatório PP	Criatório PP	41	7.2	295	M
R48	Criatório PP	Criatório PP	44	6.8	305	M
R49	Criatório PP	Criatório PP	40	7.0	310	M
R50	Criatório PP	Criatório PP	41	6.6	300	M
R51	Criatório PP	Criatório PP	44	7.2	390	M
R52	Criatório PP	Criatório PP	43	6.8	345	M
R53	Criatório PP	Criatório PP	41	8.0	230	F
R54	Criatório PP	Criatório PP	40	6.2	225	F
R55	Criatório PP	Criatório PP	39	6.8	190	F
R56	Criatório PP	Criatório PP	39	6.0	220	F
R57	Criatório PP	Criatório PP	43	6.0	355	M
R58	Criatório PP	Criatório PP	44	6.2	360	M
R59	Criatório PP	Criatório PP	39	6.2	185	F
R60	Criatório PP	Criatório PP	42	6.4	215	F
R61	Criatório PP	Criatório PP	46	6.0	305	M
R62	Criatório PP	Criatório PP	43	6.4	200	F
R63	Criatório PP	Criatório PP	43	6.4	200	F

Dentre todas as ratazanas, 30 (47,61%) eram fêmeas e 33 (52,38%) eram machos (**Tabela 5**). De acordo com os resultados, a infecção por hemoplasma não apresentou associação com o sexo das ratazanas investigadas ($p=0,11$). Dentre os machos 23/33 (69,6%) estavam infectados e 10/33 (30,4%) não apresentaram infecção. Já as fêmeas, 17/30 (56,5%) estavam infectadas, enquanto 13/30 (43,5%) não apresentaram infecção.

TABELA 5. VARIÁVEIS AGRUPADAS DE TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS. Peso (g), hematócrito (%) e proteína plasmática total (g/dL) das ratazanas amostradas separadas por sexo.

Sexo	n	Variável	N	Média	Desvio Padrao
Fêmea	30	Peso (g)	30	226,00	102,34
		HT (%)	29	37,44	3,80
		PPT (g/dL)	30	6,58	0,90
Macho	33	Peso (g)	33	250,00	136,12
		HT (%)	33	38,12	4,66
		PPT (g/dL)	33	6,54	0,85

Os valores médios para peso, hematócrito e proteína plasmática total de todas as amostras analisadas agrupadas estão descritos na **Tabela 6**. Valores separados por grupos de acordo com o local de origem/captura das amostras estão descritos na **Tabela 7**.

TABELA 5. VARIÁVEIS AGRUPADAS DE TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS. Peso (g), hematócrito (%) e proteína plasmática total (g/dL) de todas as ratazanas agrupadas.

Variável	n	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Peso (g)	63	238,57	120,86	50,00	490,00
HT (%)	62	37,80	4,26	28,00	46,00
PPT (g/dL)	63	6,56	0,87	4,60	8,40

Em relação ao local de origem, o número de ratazanas infectadas foi maior dentre aquelas que foram capturadas no Passeio Público e no Zoológico de Curitiba, quando comparadas com as ratazanas mantidas no Criatório do Passeio Público. Porém, não houve diferença estatística significativa em relação à infecção entre os três grupos ($p=0,11$).

TABELA 6. VARIÁVEIS AGRUPADAS DE TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS. Peso (g), hematócrito (%) e proteína plasmática total (g/dL) das ratazanas amostradas separadas pelos locais de origem/captura.

Local	n	Variável	N	Média	Desvio Padrão
Passeio Público	23	Peso (g)	23	213,26	114,14
		HT (%)	22	37,40	3,76
		PPT (g/dL)	23	6,95	0,93
Zoológico	20	Peso (g)	20	231,50	162,71
		HT (%)	20	34,75	3,66
		PPT (g/dL)	20	6,01	0,83
Criatório	20	Peso (g)	20	274,75	62,48
		HT (%)	20	41,30	2,53
		PPT (g/dL)	20	6,66	0,51

Os resultados obtidos através do PCR quantitativo para a infecção por hemoplasmas por meio da técnica de SYBR® Green estão contidos na **Tabela 8**. Das 63 amostras analisadas, 40 (63,5%) foram positivas e 23 (36,5%) foram negativas. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,050$) para as variáveis peso, hematócrito e proteína plasmática total entre os grupos infectados e não infectados.

TABELA 7. VARIÁVEIS AGRUPADAS DE TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS. Peso (g), hematócrito (%) e proteína plasmática total (g/dL) das ratazanas amostradas separadas por status de infecção (positivo/negativo).

Infecção	N	%	Variável	N	Média	Desvio Padrão	P
Negativo	23	36,50	Peso (g)	23	208,04	111,25	0,1522
			HT (%)	23	38,52	4,29	0,3172
			PPT (g/dL)	23	6,33	0,77	0,0976
Positivo	40	63,50	Peso (g)	40	256,12	124,00	0,1522
			HT (%)	39	37,38	4,24	0,3172
			PPT (g/dL)	40	6,69	0,90	0,0976

Os dados obtidos para as variáveis peso, hematócrito e proteína plasmática total separado por grupos de animais infectados e não infectados dentre os diferentes locais de origem/captura estão descritos na **Tabela 9**.

TABELA 8. VARIÁVEIS AGRUPADAS DE TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS. Peso (g), hematócrito (%) e proteína plasmática total (g/dL) das ratazanas amostradas separadas por local de origem/captura e status de infecção (positivo/negativo).

Local	Infecção	n	Variável	n	Média	Desvio Padrão	P
Passeio Público	Negativo	7	Peso (g)	7	164,28	94,13	0,1522
			HT (%)	7	36,71	2,81	0,5102
			PPT (g/dL)	7	6,45	0,75	0,0976
	Positivo	16	Peso (g)	16	234,68	118,13	0,1522
			HT (%)	15	37,73	4,18	0,5102
			PPT (g/dL)	16	7,17	0,93	0,0976
Zoológico	Negativo	5	Peso (g)	5	126,00	142,18	0,1522
			HT (%)	5	35,60	5,50	0,6798
			PPT (g/dL)	5	5,44	0,81	0,0976
	Positivo	15	Peso (g)	15	266,66	157,65	0,1522
			HT (%)	15	34,46	3,04	0,6798
			PPT (g/dL)	15	6,20	0,77	0,0976
Criatório	Negativo	11	Peso (g)	11	273,18	66,71	0,1522
			HT (%)	11	41,00	3,22	0,5470
			PPT (g/dL)	11	6,65	0,43	0,0976
	Positivo	9	Peso (g)	9	276,66	60,82	0,1522
			HT (%)	9	41,66	1,41	0,5470
			PPT (g/dL)	9	6,66	0,63	0,0976

A média dos hematócritos obtidos das ratazanas provenientes do criatório do Passeio Público foi maior do que das ratazanas capturadas no Zoológico e no Passeio Público (**Figura 4**), mas não estatisticamente significativo ($p=0,31$). De maneira similar, a média dos hematócritos das ratazanas infectadas e não infectadas, quando agrupados, foi discretamente maior no grupo negativo ($38,52 \pm 4,29$) do que no grupo positivo ($37,38 \pm 4,24$), como pode ser observado no diagrama da **Figura 5**. Tal diferença não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0,31$).

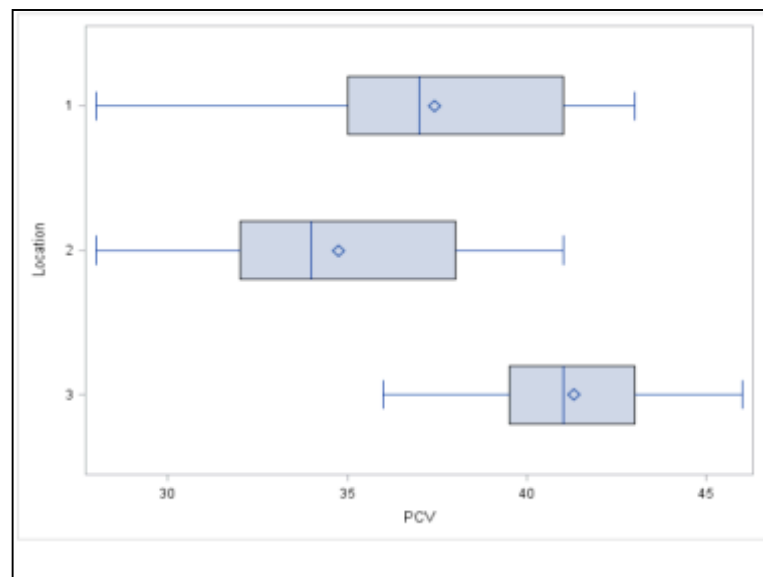


FIGURA 4. BOX PLOT LOCAL DE ORIGEM vs. HEMATÓCRITO. Diferença entre as médias dos hematócritos das amostras para os diferentes locais de origem das ratazanas (1 = Passeio Público; 2 = Zoológico; 3 = Criatório do Passeio Público).

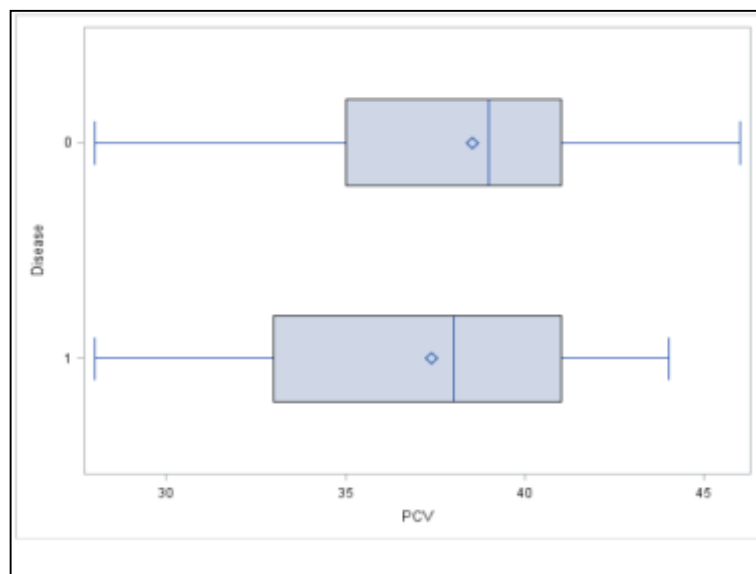


FIGURA 5. BOX PLOT INFECÇÃO vs. HEMATÓCRITO. Todas as ratazanas agrupadas (0 = positivo, animais infectados; 1 = negativo, animais não infectados).

De maneira geral, os valores de hematócrito para os animais infectados e não infectados apresentaram valores inconstantes para os diferentes locais de origem/captura. Os animais infectados do Passeio Público tiveram resultados maiores de hematócrito ($37,73 \pm 4,18$) do que os animais não infectados ($36,71 \pm 2,81$), enquanto que os animais capturados no Zoológico apresentaram resultados contrários, sendo hematócrito maior para o grupo não infectado ($35,60 \pm 5,50$) do que o grupo infectado ($34,46 \pm 3,04$). O grupo de ratazanas provenientes do criatório do Passeio Público apresentou valores mais constantes e praticamente iguais para os grupos infectados ($41,66 \pm 1,41$) e não infectados ($41,00 \pm 3,22$). Os diagramas de comparação das médias (box plot) dos hematócritos dos animais infectados e não infectados para os diferentes locais de origem/captura estão descritos nas **Figuras 6, 7 e 8**.

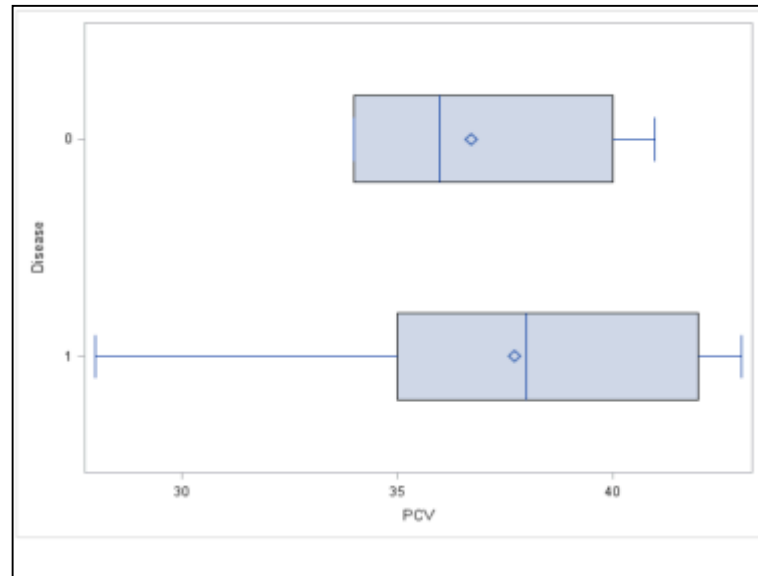


FIGURA 6. BOX PLOT INFECÇÃO vs. HEMATÓCRITO (RATAZANAS DO PASSEIO PÚBLICO) (0 = positivo, animais infectados; 1 = negativo, animais não infectados).

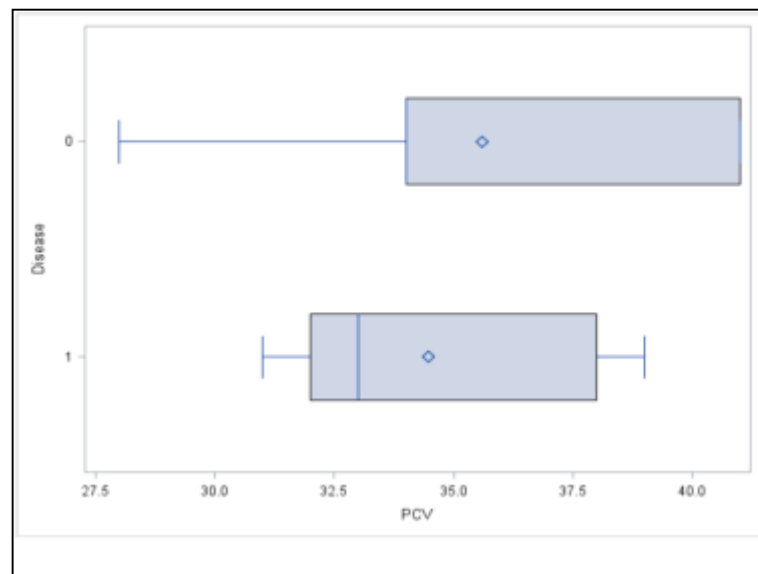


FIGURA 7. BOX PLOT INFECÇÃO vs. HEMATÓCRITO (RATAZANAS DO ZOOLOGICO) (0 = positivo, animais infectados; 1 = negativo, animais não infectados).

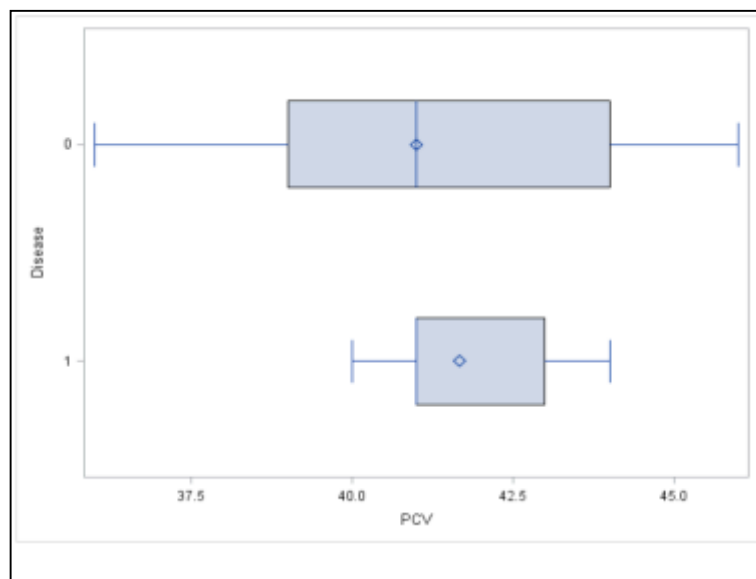


FIGURA 8. BOX PLOT INFECÇÃO vs. HEMATÓCRITO (RATAZANAS DO CRIATÓRIO) (1 = positivo, animais infectados; 2 = negativo, animais não infectados).

A mesma tendência pôde ser observada em relação ao peso das ratazanas. Apesar de a média do peso das ratazanas não infectadas ($208,04\text{g} \pm 111,25$) ter sido menor do que o peso das ratazanas infectadas ($256,12\text{g} \pm 124,00$), não houve diferença significativa ($p=0,15$) quando comparados os grupos (**Figura 9**).

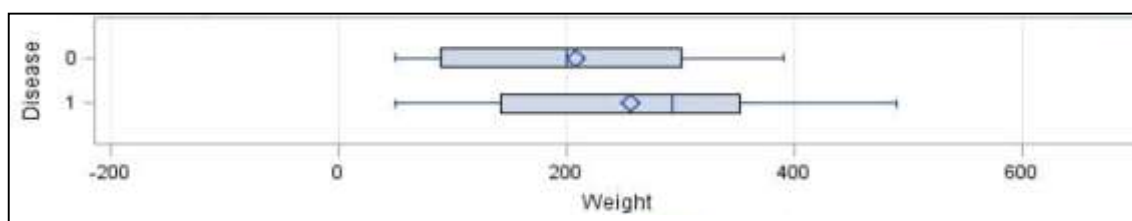


FIGURA 9. BOX PLOT INFECÇÃO vs. PESO CORPORAL. Comparação das médias de peso de todas as ratazanas agrupadas (1 = positivo, animais infectados; 2 = negativo, animais não infectados).

Em relação à proteína plasmática total, a média entre os animais não infectados ($6,33\text{g/dL} \pm 0,77$) e os animais infectados ($6,69\text{g/dL} \pm 0,90$) não diferiu de maneira estatisticamente significativa ($p=0,09$) quando comparados os dois grupos (**Figura 10**), ou quando comparados pelos diferentes locais de origem (**Tabela 9**).

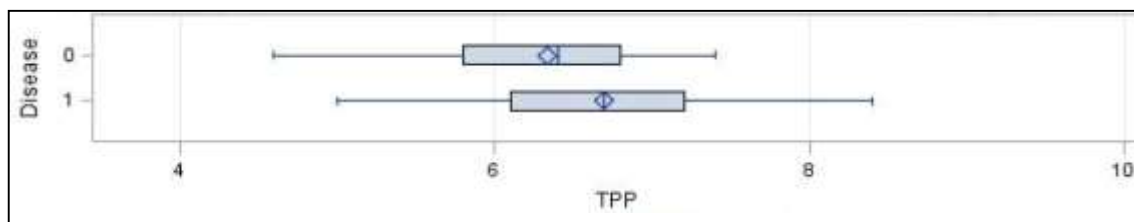


FIGURA 10. BOX PLOT INFECÇÃO vs. PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL. Comparação das médias de PPT de todas as ratazanas agrupadas (1 = positivo, animais infectados; 2 = negativo, animais não infectados).

5.1 MICROSCOPIA

As imagens obtidas por meio do escâner de lâminas foram observadas à procura de estruturas arredondadas, basofílicas, de tamanho diminuto (aproximadamente 1 µm), compatíveis com hemoplasmas, como previamente descrito (NEIMARK et al., 2001; MESSICK, 2004). A presença dessas estruturas foi comparada com os resultados das análises moleculares.

A **Figura 11** mostra um dos campos escaneados do esfregaço sanguíneo da amostra **R10**, onde podem ser visualizadas tais estruturas compatíveis com hemoplasmas. Tal amostra foi comprovada positiva para a infecção por hemoplasmas através da técnica de SYBR® Green. A **Figura 12** mostra um campo do esfregaço sanguíneo da amostra **R15**, também positiva para a infecção por hemoplasmas, porém, sem apresentar estruturas compatíveis na superfície das células.

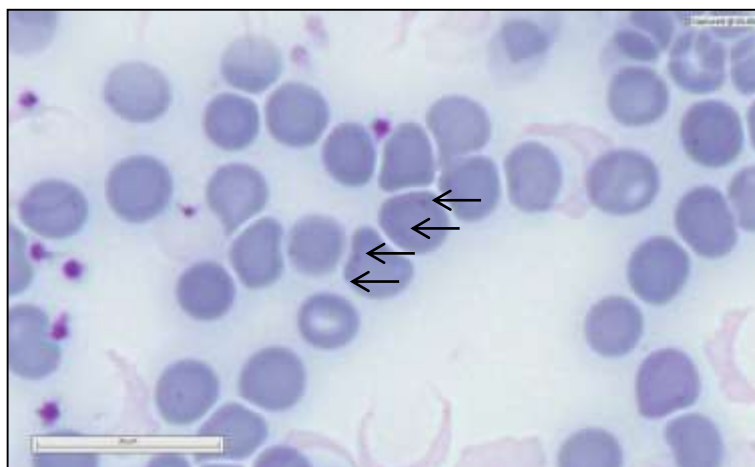


FIGURA 11. ESFREGAÇO SANGUÍNEO DA AMOSTRA R10. Amostra positiva na técnica de SYBR® Green para a infecção por micoplasma hemotrópico. Estruturas compatíveis com micoplasmas hemotrópicos estão destacadas (setas). Coloração de May-Grünwald - Giemsa (630X).

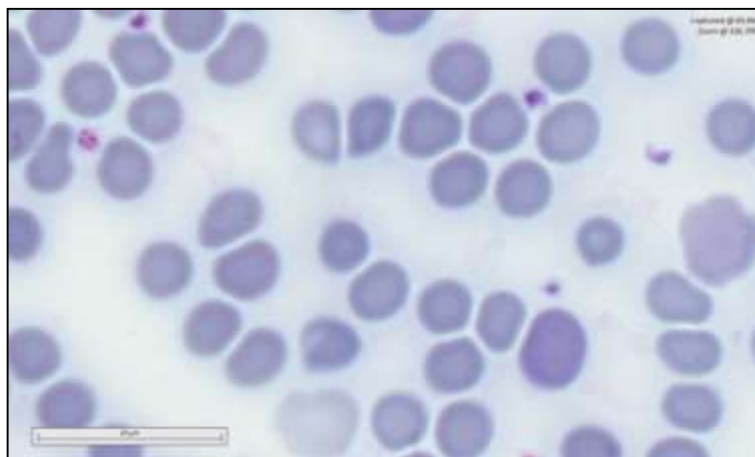


FIGURA 12. ESFREGAÇO SANGUÍNEO DA AMOSTRA R15. Amostra positiva na técnica de SYBR® Green para a infecção por micoplasma hemotrópico. Não há presença de estruturas compatíveis na superfície dos eritrócitos. Coloração de May-Grünwald - Giemsa (630X).

A média calculada de estruturas compatíveis com hemoplasmas contadas em 1000 células nos esfregaços sanguíneos também foi comparada (**Figura 13**). Para os animais não infectados a média foi de $0,09 \pm 0,08$, enquanto que para os animais infectados foi de $0,09 \pm 0,08$. Não houve diferença significativa entre os valores dos dois grupos ($p=0,87$).

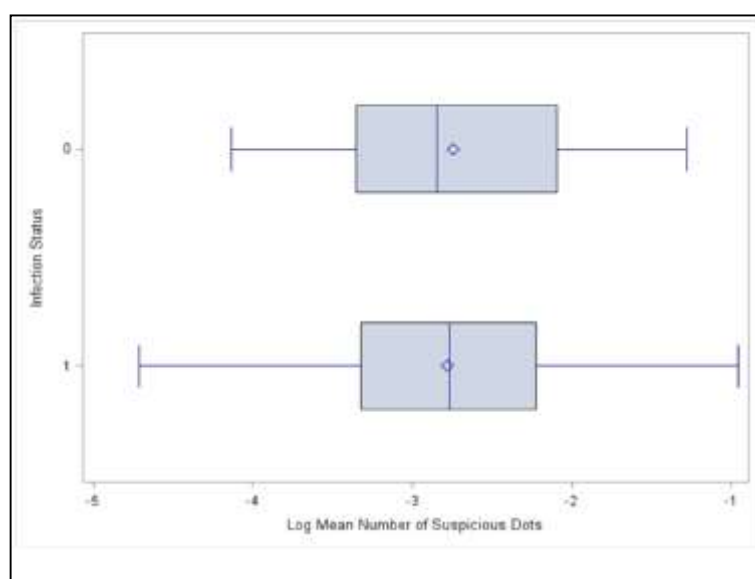


FIGURA 13. BOX PLOT INFECÇÃO vs. MICROSCOPIA. Comparação entre amostras infectadas e não infectadas com a média de estruturas compatíveis com hemoplasmas por eritrócito (0 = positivo, animais infectados; 1 = negativo, animais não infectados).

5.3 ANÁLISES MOLECULARES

Os dados referentes à análise de ácidos nucleicos estão descritos na **Tabela 10** e estão relacionadas às amostras que foram escolhidas para as análises moleculares dentre as duplicatas obtidas na extração de DNA.

TABELA 9. CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS DAS AMOSTRAS EXTRAÍDAS. Resultados da análise das amostras por NanoDrop 2000c (ThermoScientific), para a quantificação de ácidos nucleicos.

AMOSTRA	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
R01	18,88	0,378	0,216	1,75	1,18
R02	34,29	0,686	0,395	1,73	1,69
R03	3,04	0,061	0,051	1,19	0,14
R04	11,85	0,237	0,148	1,6	1,05
R05	18,25	0,365	0,196	1,86	0,51
R06	12,67	0,253	0,157	1,61	1,63
R07	31,62	0,632	0,352	1,8	0,82
R08	39,46	0,789	0,429	1,84	1,58
R09	35,38	0,708	0,388	1,82	1,68
R10	14,82	0,296	0,198	1,5	0,91
R11	8,61	0,172	0,11	1,56	0,59
R12	26,3	0,526	0,296	1,78	0,54
R13	35,03	0,701	0,387	1,81	0,35
R14	25,67	0,513	0,306	1,67	1,17
R15	22,01	0,44	0,25	1,76	0,77
R16	34,2	0,684	0,363	1,88	1,57
R17	22,16	0,443	0,26	1,71	1,5
R18	22,9	0,458	0,275	1,67	0,49
R19	1,1	0,022	0,025	0,87	0,26
R20	16,41	0,328	0,179	1,83	0,09
R21	9,92	0,198	0,126	1,58	0,55
R22	24,33	0,487	0,281	1,73	1,61
R23	23,11	0,462	0,276	1,67	1,37
R24	34,59	0,692	0,376	1,84	0,76
R25	58,39	1,168	0,643	1,81	1,07
R26	13,78	0,276	0,171	1,61	0,73
R27	13,84	0,277	0,165	1,68	1
R28	12,74	0,255	0,174	1,46	0,19
R29	23,06	0,461	0,264	1,75	0,71
R30	14,44	0,289	0,183	1,58	0,26
R31	35,63	0,713	0,386	1,85	0,4
R32	51,29	1,026	0,552	1,86	0,65

TABELA 10. CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS DAS AMOSTRAS EXTRAÍDAS. Resultados da análise das amostras por NanoDrop 2000c (ThermoScientific), para a quantificação de ácidos nucleicos.

(Continuação e/ou conclusão)					
R33	26,33	0,527	0,273	1,93	1,07
R34	27,51	0,55	0,292	1,89	1,08
R35	25,26	0,505	0,255	1,98	0,29
R36	13,12	0,262	0,159	1,65	1,34
R37	43,22	0,864	0,462	1,87	1,01
R38	23,32	0,466	0,253	1,84	1,98
R39	6,17	0,123	0,098	1,26	0,18
R40	5,56	0,111	0,07	1,6	0,49
R41	35,79	0,716	0,376	1,91	1,02
R42	4,62	0,092	0,061	1,53	0,03
R43	12,56	0,251	0,142	1,77	0,37
R44	13,34	0,267	0,172	1,55	0,57
R45	5,97	0,119	0,091	1,31	0,09
R46	2,28	0,046	0,026	1,77	0,03
R47	3,18	0,064	0,059	1,09	0,56
R48	20,79	0,416	0,253	1,65	0,13
R49	13,32	0,266	0,168	1,59	0,87
R50	14,91	0,298	0,182	1,64	1,01
R51	29,35	0,587	0,344	1,7	0,33
R52	33,14	0,663	0,354	1,87	0,53
R53	13,15	0,263	0,18	1,46	1,4
R54	13,85	0,277	0,176	1,58	0,36
R55	27,78	0,556	0,309	1,8	0,15
R56	17,48	0,35	0,19	1,84	0,19
R57	2,39	0,048	0,043	1,12	0,02
R58	7,06	0,141	0,099	1,43	0,26
R59	10,85	0,217	0,127	1,71	0,25
R60	16,45	0,329	0,214	1,54	0,55
R61	10,81	0,216	0,141	1,53	0,23
R62	32,06	0,641	0,375	1,71	1,62
R63	15,15	0,303	0,192	1,58	1,37

5.3.1 PCR Convencional para GAPDH

Todas as amostras testadas por PCR convencional para o gene da GAPDH foram positivas e apresentaram uma banda de aproximadamente 400 pb (**Figura 14**). Dentre todas as 63 amostras extraídas, nenhuma falhou em apresentar amplificação e, portanto, nenhuma amostra foi excluída do presente estudo.

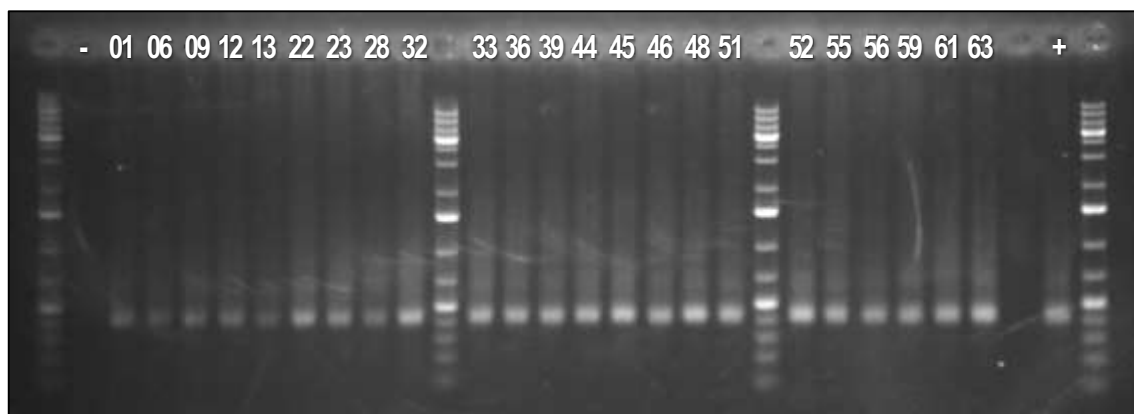


FIGURA 14. GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO. Amplificações positivas para amostras testadas por PCR convencional para o gene da GAPDH, apresentando banda de aproximadamente 400 pb.

5.3.2 Triagem Universal para Hemoplasmas (SYBR® Green)

Das 63 amostras analisadas, 40 (63,49%) foram positivas para a infecção por hemoplasmas através do método de SYBR® Green e a utilização de *primers* universais (WILLI et al., 2009). Das 40 amostras positivas, 23 (36,50%) foram consideradas fortemente positivas ($C_T < 34$) e 17 (26,98%) fracamente positivas ($C_T > 34$). As amostras, com seus locais de origem e respectivas T_M 's estão descritas na **Tabela 11**.

TABELA 11. RELAÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PELA TÉCNICA DE SYBR® GREEN. Amostras positivas para infecção por hemoplasmas separadas por local de origem/captura e temperatura de *melting* obtida na curva de dissociação pela técnica de PCR quantitativo baseada na técnica de SYBR® Green.

	Passeio Público		Zoológico		Criatório Passeio Público	
T_m	C_T<34	C_T>34	C_T<34	C_T>34	C_T<34	C_T>34
73	R02 R16		R10 R15 R40	R29 R30		
74	R07 R11 R24	R17 R18	R26 R38 R42 R43	R31 R34	R47 R50 R58	
75	R20	R05 R14 R21	R41			R54 R60
76	R03 R04 R19 R25	R08	R37	R35		R49 R53 R57 R62
77			R27			

No Passeio Público, 16/23 (69,56%) amostras foram positivas pela técnica de SYBR® Green, Das quais, dez (43,47%) fortemente positivas e 6 (26,08%) fracamente positivas. Dentre as amostras do Zoológico, 15/20 (75,0%) foram positivas, sendo dez (50,0%) fortemente positivas e 5 (25,0%) fracamente positivas. Para fins de análise estatística e interpretação dos resultados, os resultados foram agrupados em positivos e negativos, uma vez que não havia sido estipulada uma curva normal de concentração de DNA bacteriano disponível para o teste aplicado.

5.3.3 Reamplificação de Amostras Suspeitas

Um total de 18 amostras foram consideradas suspeitas por terem apresentado um C_T maior que 34 ciclos quando analisadas pela técnica de SYBR® Green. Tais amostras foram reamplificadas com sucesso através do uso de PCR convencional (**Figura 15**) e consideradas, portanto fracamente positivas.

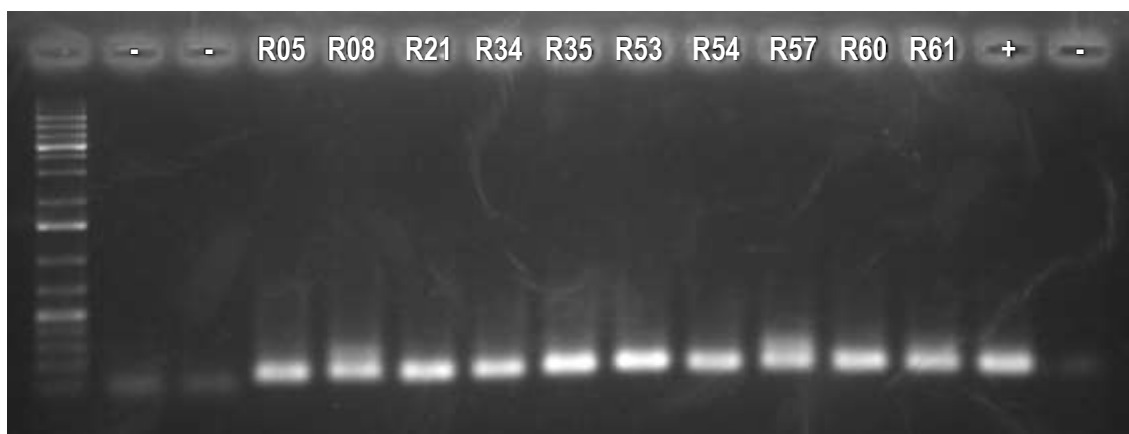


FIGURA 15. GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO. Reamplificações positivas das amostras que apresentaram resultado positivo para a infecção por micoplasma hemotrópico pela técnica de SYBR® Green, porém com $C_T > 34$. Bandas muito fracas de amplificações inespecíficas (dímeros de *primers* ou acúmulo de *primers* não hibridizados) podem ser observadas nos controles negativos.

5.3.4 RESULTADOS SEQUENCIAMENTO DE 600pb

Do total de amostras positivas no SYBR® Green, foi selecionada para sequenciamento uma amostragem referente a 50% das amostras positivas para cada T_M (72, 73, 74, 75 e 76), num total de 28 amostras. Das 40 amostras positivas para o

SYBR® Green, 28 foram sequenciadas utilizando os *primers* desenhados para amplificação de um produto de aproximadamente 600 pb e submetidas a sequenciamento de Sanger. Dessas, 26 amostras apresentaram diferentes percentuais de identidade com *M. haemomuris* (doze 100%, onze 99%, duas 98% e uma 96% de identidade) quando comparadas com sequências depositadas no GenBank®. O percentual de identidade e os números de acesso das sequências comparadas estão descritos na **Tabela 12**.

TABELA 11. RESULTADOS DO SE QUENCIAMENTO DE AMOSTRAS POSITIVAS. Sequências parciais do gene 16S rRNA de 28 amostras amplificadas, sequenciadas e comparadas com sequências depositadas no Genbank. Espécie identificada, percentual de identidade e números de acesso.

ESPÉCIE	N	%	Nº DE ACESSO
<i>M. haemomuris</i>	10	100	
	6	99	AB758439.1
	1	98	
	1	100	
	4	99	AB820289.1
	2	98	
	1	100	
	1	96	AB918692.1
	1	94	JQ689949.1
	1	99	JF144103.1
'C M. turicensis'	1	94	JQ689949.1
Unc. Bac. Cl. ncd1617b04c1	1	99	JF144103.1

Uma das amostras sequenciadas apresentou 94% de identidade com o micoplasma hemotrópico descrito em felinos '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (número de acesso JQ689949.1) (**Figura 16**). A qualidade do sequenciamento pode ser visualizada no cromatograma através do programa FinchTV Viewer versão 1.4.0 (Geospiza Inc., Seattle, Washington, EUA) na **Figura 17**.

Outra amostra apresentou 99% de identidade com um clone bacteriano não cultivado (número de acesso JF144103.1) proveniente de um estudo sobre dermatite atópica (KONG et al., 2012) e foi, portanto, considerada contaminação e descartada do presente estudo.

FIGURA 16. RESULTADO DO ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA R25. Amostra apresentando 94% de identidade com o micoplasma hemotrópico descrito em felinos '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (JQ689949.1).

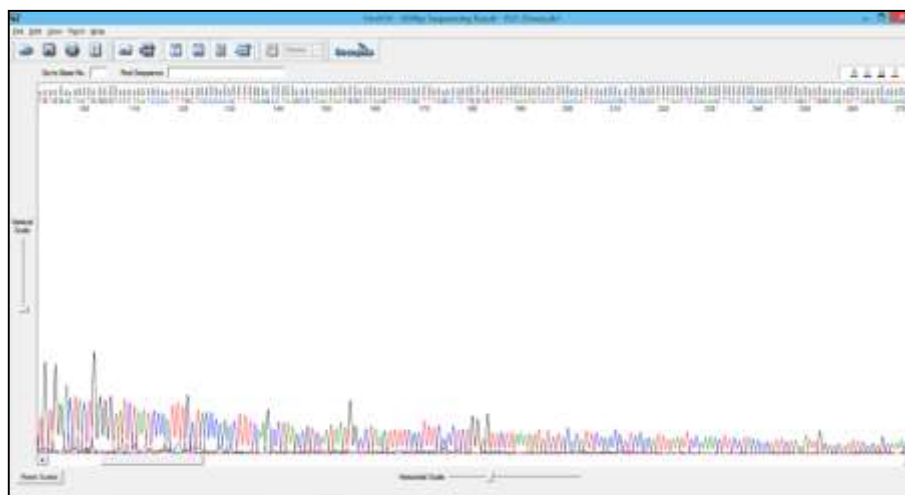


FIGURA 17. CROMATOGRAMA DO SEQUENCIAMENTO DA AMOSTRA R25. Análise cromatográfica da sequência parcial de aproximadamente 600 pb do gene 16S rRNA da amostra R25 no programa FinchTV Viewer versão 1.4.0.

5.3.5 RESULTADOS SEQUENCIAMENTO DE 1300pb

Duas amostras foram selecionadas para sequenciamento de um fragmento maior do gene 16S rRNA de aproximadamente 1300 pb, com a utilização dos novos *primers* desenhados Rod1300 Fw1, Rod1300 Fw2 e Rod1300 Rv. Uma amostra (**R37**) cuja sequência do fragmento menor de aproximadamente 600 pb havia sido 100% idêntica ao *M. haemomuris* e apresentava uma curva de dissociação limpa (pico único) na técnica de SYBR® Green (**Figura 18**), foi amplificada para análise e construção de árvore filogenética. Purificada a partir do gel de agarose, a eluição de 19 ng/μL gerou uma sequência de 1148 nucleotídeos (**Figura 19**), 100% idêntica à sequência de DNA do gene 16S rRNA do *M. haemomuris* (número de acesso AB758439.1). O cromatograma desta sequência está representado na **Figura 20**.

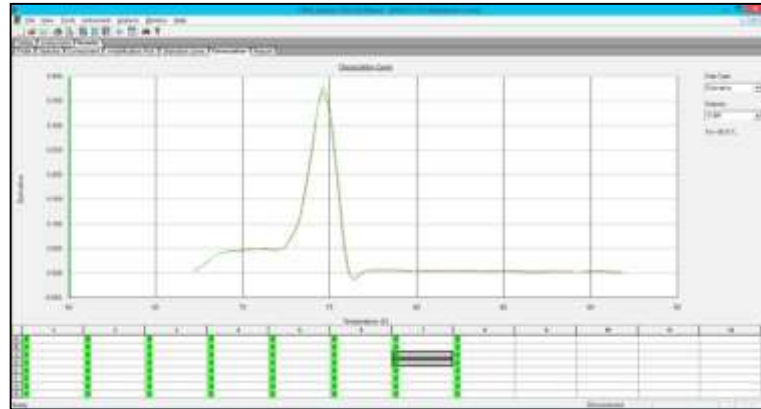


FIGURA 18. CURVA DE DISSOCIAÇÃO DA AMOSTRA R37. Curva de dissociação obtida a partir de PCR quantitativo através da técnica de SYBR® Green, apresentando apenas um pico único pra ambas as duplicatas.

R37

```

AGTGATTCCAACCTTCAAAAAGGCGAATTGCAGCCTTTTATCCGGACTGAGATGAGCTTTTAG
TGATTAGCTTGCCATCGCTGGCTTGCGACACGTTGTACCCACCATTGTAACACGTTTGCGGC
CCAAGATATAAGGGGCATGATGACTTGACGTGATCCCATCCTTCCATACATTACTGTTTCA
TCTCTTTAGAAAAGTTAACTAAAGAGTAGGGTTGCGCTCGTTTCAGGACTTAACCAGACATCT
CATGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTCACCCTGATAACCTCCACTTTATTTT
TAAAGCTTTGCAGGGGATGTCAAATCTTGTAAGGTTTTTCGTGTATTGTGCAATTAAGCAA
CATGTTCCACCACTTGTTTCAGGTCCCCGTCATTCCTTTGAGTTTCATATTTGCATATGTAC
TACTCAGGCGGGATATTTAACACGTAAGCTACAACGCTGAGACTCAAGTCCCAACATCTAAT
ATCCATCGTTTACGGTGTGGACTACTGGGGTATCTAATCCCATTTGCTCCCCACACTTTCGA
GCCTAAGCGTCAATATCGGCCTAAGTTTTTCGCCTTCGCCTCTGGTGTCTTGAATATATCTA
CACATTTCCACCGCTCCACATTCAATTCCAAAACCTTTCTACCGTATTCTAGAAAAGCAGTATT
CTGCGCATACAACCGTTGAGCGGCTGCATTTAACACAGAACTTACCAATCCGCCTGCGCTCG
CTTTACGCCCAATAAATCCGAATAACGCTCGCGACCTATGTATTACCGCAGCTGCTGGCACA
TAGTTTGCTGTCACTTATTCACCTGGGTACCATCATCATTTTCCCCAATAAAAGAACTTTACA
ATCAAAAAGACCTTCATCATTACATGGCATCACTCCATCAGGCTTTTCGCCATTGTGGAAG
ATTCCCTACTGCTGCTTCCCGTAGGAATATGGGCCGTATCTCAATCCCATTTGTGGCTGTTCA
TCCTCTTAGACCAGCTATCTATCACTGCCTTGGTGGGCTATTATCCCGCCAACCTAGCTAATA
GAAAATACTCCAATCTCCAAGTGGCTTGCGCCTTTAAAGCCAACCTCATGTGAGGCTGGCTC
CTATAGGACATTAATTACTCTTTTGAATAGCT

```

FIGURA 19. SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA R37. Sequência de 1148 nucleotídeos obtida através de banda purificada de gel de agarose em eluição de 19 ng/μL da amostra R37.

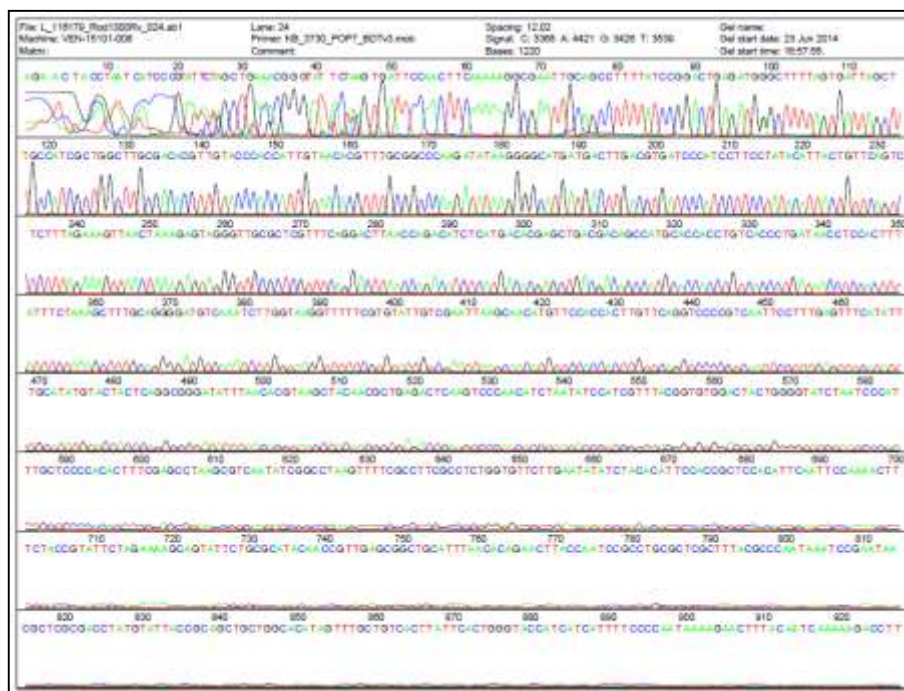


FIGURA 20. TRAÇADO CROMATOGRÁFICO DO SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA R37. Análise cromatográfica da qualidade do sequenciamento de 1148 nucleotídeos da amostra R37.

A amostra **R25**, cuja sequência de aproximadamente 600 pb havia sido 94% idêntica ao '*Candidatus M. turicensis*', também foi amplificada para análise e construção de árvore filogenética. Purificada a partir do gel de agarose, a eluição de 38 ng/μL gerou uma sequência de 1154 nucleotídeos (**Figura 21**) com 98% de identidade com uma sequência extraída de um micoplasma hemotrópico encontrado em um roedor de pequeno porte da espécie *Micromys minutus*, depositada no Genbank® sob o número de acesso KC863983.1 por Hornok *et al.* (2014), mas não publicada. O cromatograma da sequência obtida para a amostra R25 está representado na **Figura 22** e o resultado do alinhamento da sequência parcial obtida pode ser visualizado na **Figura 23**. Em segundo lugar, a amostra apresentou 95% de identidade com o micoplasma hemotrópico '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (número de acesso JQ689950.1). Não foram encontrados outros relatos dessa espécie de hemoplasma em outros hospedeiros em buscas realizadas no Pubmed e Genbank®.

R25

```

AGCTGACACGGGATTACTAGTGATTCCAACCTCAAAAAGGCGAATTGCAGCCTTTTATCCGG
ACTGAGACGAGTTTTTGGTGATTAGCTCAGTATCGCTAGCTTGCAGACACATTGTACTCGCCAT
TGTAACACGTTTTCGGGCCCCAAGGCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTGATCCCAACCTTCC
TCTACATTACTGTGCAGTCTCTTTAGATAATCAACTAAAGAGTAGGGTTGCGCTCGTTGCGG
GACTTAACCAAAACATCTCATGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTACACCTCGAT
AACCTCCGCCATGTTTCCATGGTTTCGCGAGGGATGTCAAACCTTGGTAAGGTTTTTCGTGT
ATTATCGAATTAAGCAACATGTTCCACCACTTGTTTCAGGTCCCGTCAATTCTTTGAGTTT
CATATTTGCATATGTACTACCCAGGCGGGGTATTTAACACGTAAGCTACAACGCCGAATCTC
AAAAATCCGACATCTAATACCCATCGTTTACGGTGTGGACTACTGGGGTATCTAATCCCATT
GCTACCCACACTTTCAGCCTAAGCGTCAATAATGGCCTAAGTTTTTCGCTTTTCGCCCTCTGGT
GTTCTTAAATATATCTACACATTCCACCGCTCCACATTTAATTCAAAACTTCTTACCACAT
TCTAGATTGGCAGTATTTCGGTGCACAACTGTTGAGCAGCTGCTTTTAAACACAGAATTGT
CAATCCGCCTGCGCTTTCGTTTACGCCCAATAAATCCGAATAACGCTCGCGACCTATGTATTA
CCGCAGCTGCTGGCACATAGTTTGTGTCACTTATTCAGGGGTACCATCAGAGTTTTTCCCC
CCTAAAGAATTTTACGACCAAAAAGGCCCTTCATCATTACATGGCATTGCTCCATCAGGCT
TTCGCCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCTTCCCGTAGGAATATGGGCCGATCTCAAT
CCCATTGTGGCTGTTTATCCTCTAAGACCAGCTATCTATCATCGCCTTGGTGGGCTTTTATC
TCACCAACTAGCTAATAGAACATATTCCAATCCTCCTGCGGTTTGCACCTTTAAAAACCTC
TCCGGGGAGAGGGTCTAGTATGGGGTATTAATCACATT

```

FIGURA 21. SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA R25. Sequência de 1154 nucleotídeos obtida através de banda purificada de gel de agarose em eluição de 38 ng/μL da amostra R25.

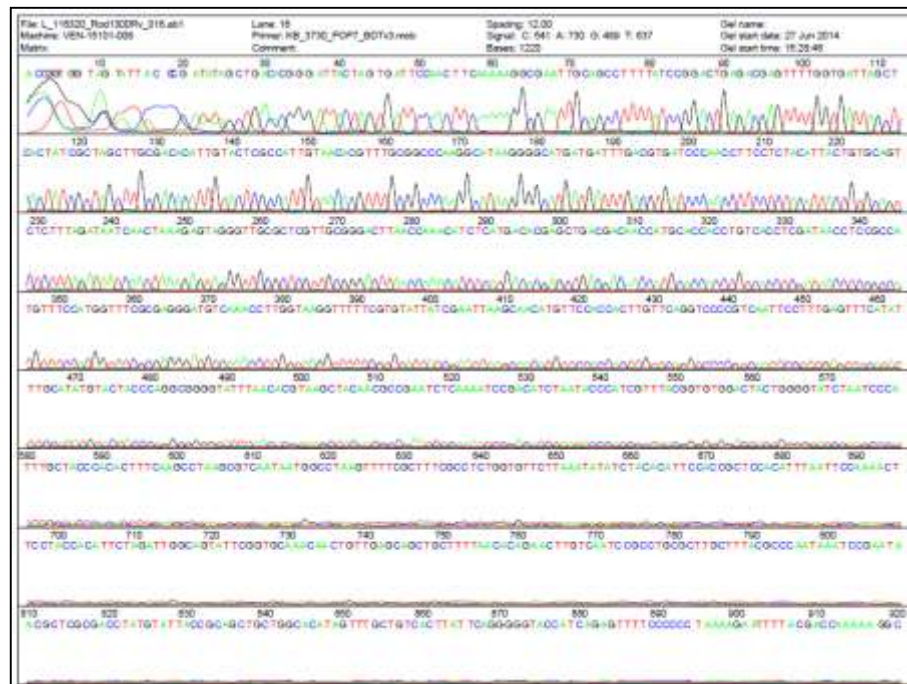


FIGURA 22. TRAÇADO CROMATOGRÁFICO DO SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA R25. Análise cromatográfica da qualidade do sequenciamento de 1154 nucleotídeos da amostra R25.

Uncultured Mycoplasma sp. clone S_231K4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence					
Sequence ID: gb KC863983.1 Length: 1397 Number of Matches: 1					
Range 1: 129 to 1282 GenBank Graphics			▼ Next Match ▲ Previous Match		
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
2032 bits(1100)	0.0	1136/1154(98%)	0/1154(0%)	Plus/Minus	
Query 1	AGCTGACACGGGATTACTAGTGATTCCAACCTTCAAAAAGGCGAATTGCAGCCTTTTATCC	60			
Sbjct 1282	AGCTGACACGGGATTACTAGTGATTCCAACCTTCAAAAAGGCGAATTGCAGCCTTTTATCC	1223			
Query 61	GGACTGAGACGAGTTTTGGTGATTAGCTCACTATCGCTAGCTTGCAGACATTGTACTCG	120			
Sbjct 1222	GGACTGAGACGAGTTTTAGTGATTAGCTCACTATCGCTAGTTTGCAACACATTGTACTCG	1163			
Query 121	CCATTGTAACACGTTTGCGCCCAAGGCATAAGGGGCATGATGTTTGACGTGATCCCAA	180			
Sbjct 1162	CCATTGTAACACGTTTGCGCCCAAGGCATAAGGGGCATGATGTTTGACGTGATCCCAA	1103			
Query 181	CCTTCCTCTACATTACTGTGAGTCTCTTTAGATAATCAACTAAAGAGTAGGGTTGCGCT	240			
Sbjct 1102	CCTTCCTCTACATTACTGTGAGTCTCTTTAGATAATCAACTAAAGAGTAGGGTTGCGCT	1043			
Query 241	CGTTGCGGACTTAACCAAACATCTCATGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTG	300			
Sbjct 1042	CGTTGCGGACTTAACCAAACATCTCATGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTG	983			
Query 301	TCACCTCGATAACCTCCGCCATGTTTCCATGGTTTTCGCGAGGGATGTCAAACCTTGGTAA	360			
Sbjct 982	TCACCTCGATAACCTCCGCCATGTTTCCATGGTTTTCGCGAGGGATGTCAAACCTTGGTAA	923			
Query 361	GGTTTTTCGTGATTATCGAATTAAGCAACATGTTCCACCACTTGTTCAGGTCCCCGTCA	420			
Sbjct 922	GGTTTTTCGTGATTATCGAATTAAGCAACATGTTCCACCACTTGTTCAGGTCCCCGTCA	863			
Query 421	ATTCTTTGAGTTTCATATTTGCATATGTACTACCCAGGCGGGGTATTTAACACGTAAGC	480			
Sbjct 862	ATTCTTTGAGTTTCATATTTGCATATGTACTACCCAGGCGGGGTATTTAACACGTAAGC	803			
Query 481	TACAACGCCGAATCTCAAAATCCGACATCTAATACCCATCGTTTACGGTGTGGACTACTG	540			
Sbjct 802	TACAACGCCGAATCTCAAAATCCGACATCTAATACCCATCGTTTACGGTGTGGACTACTG	743			
Query 541	GGGTATCTAATCCCATTTGCTACCCACACTTTCAAGCCTAAGCGTCAATAATGGCCTAAG	600			
Sbjct 742	GGGTATCTAATCCCATTTGCTACCCACACTTTCAAGCCTAAGCGTCAATAATGGCCTAAG	683			
Query 601	TTTTCGCTTTCGCTCTGGTGTTCTTAAATATATCTACACATTCACCGCTCCACATTTA	660			
Sbjct 682	TTTTCGCTTTCGCTCTGGTGTTCTTAAATATATCTACACATTCACCGCTCCACATTTA	623			
Query 661	ATTCCAAAACCTTCTACCACATTCTAGATTGGCAGTATTCGGTGCAAAACACTGTTGAGC	720			
Sbjct 622	ATTCCAAAACCTTCTACCACATTCTAGATGAACAGTATTCGGTGCAAAACACTGTTGAGC	563			
Query 721	AGCTGCTTTTAAACACAGAACTTGTCAATCCGCCTGCGCTTGTTCACGCCAATAAATCC	780			
Sbjct 562	AGCTGCTTTTAAACACAGAACTTGTACATCCGCCTGCGCTTGTTCACGCCAATAAATCC	503			
Query 781	GAATAACGCTCGCGACCTATGTATTACCGCAGCTGCTGGCAGATAGTTTGCTGTCACTTA	840			
Sbjct 502	GAATAACGCTCGCGACCTATGTATTACCGCAGCTGCTGGCAGATAGTTTGCTGTCACTTA	443			
Query 841	TTACAGGGGTACCATCAGAGTTTTCCCCCTAAAAGAAATTTACGACCAAAAAGGCCTTC	900			
Sbjct 442	TTACAGGGGTACCATCAGAGTTTTCCCCCTAAAAGAAATTTACGACCAAAAAGGCCTTC	383			
Query 901	ATCATTACATGGCATTGCTCCATCAGGCTTTCGCCATTGTGGAAGATTCCTACTGCT	960			
Sbjct 382	ATCATTACATGGCATTGCTCCATCAGGCTTTCGCCATTGTGGAAGATTCCTACTGCT	323			
Query 961	GCTTCCCGTAGGAATATGGGCGTATCTCAATCCCATTTGTGGCTGTTTCATCCTCTAAGAC	1020			
Sbjct 322	GCTTCCCGTAGGAATATGGGCGTATCTCAATCCCATTTGTGGCTGTTTCATCCTCTAAGAC	263			
Query 1021	CAGCTATCTATCATCGCCTTGGTGGGCTTTATCTACCAACTAGCTAATAGAACATATT	1080			
Sbjct 262	CAGCTATCTATCATCGCCTTGGTGGGCTTTAACTACCAACTAGCTAATAGAACATATT	203			
Query 1081	CCAATCCTCCTGCGGTTTGCACCTTTAAAAACCTCTCCGGGAGAGGGGTCTAGTATGGG	1140			
Sbjct 202	CCAATCCTCCTGCGGTTTGCACCTTTAAAAACCTCTCCGGGAGAGGGGTCTAGTATGGG	143			
Query 1141	GTATTAATCACTTT	1154			
Sbjct 142	GTATTAATCGCTTT	129			

FIGURA 23. RESULTADO DO ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA R25. Amostra apresentando 98% de identidade com o micoplasma hemotrópico descrito em um pequeno roedor europeu da espécie *Micromys minutus* (KC863983.1).

5.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A história evolutiva foi inferida pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU e NEI, 1987). A árvore com a soma do comprimento dos ramos de 5,36444540 é mostrada na **Figura 24**. A porcentagem de árvores idênticas, em que a taxa associada agrupou-se no teste de *bootstrap* (1000 repetições) está presente ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). A análise envolveu 19 seqüências de nucleotídeos. Todas as posições que contêm lacunas e dados ausentes foram excluídas. Houve um total de 899 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no software MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

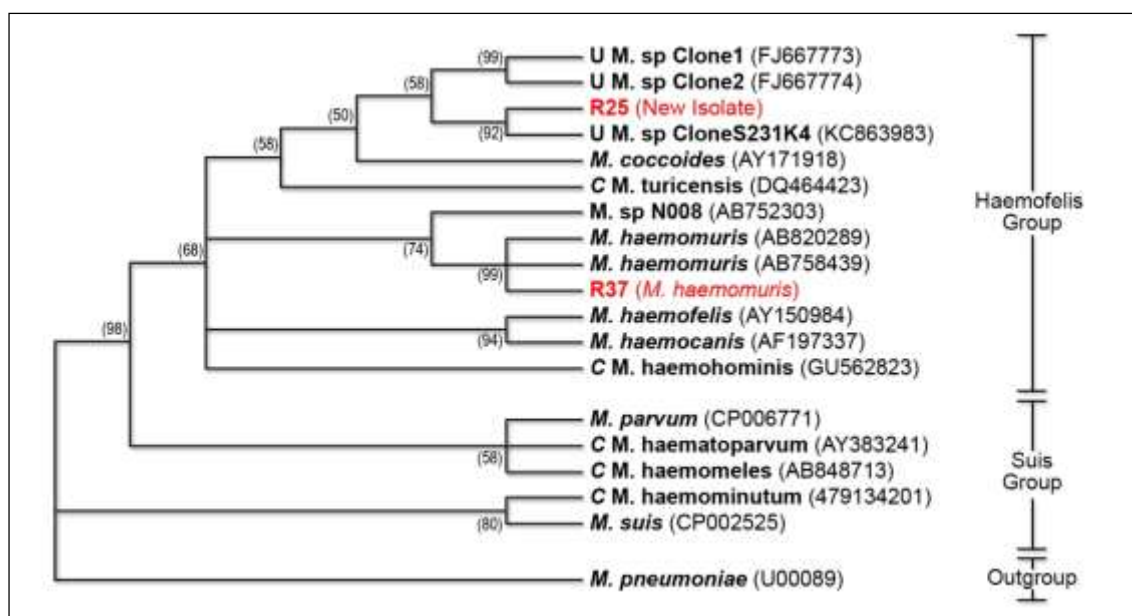


FIGURA 24. ÁRVORE FILOGENÉTICA Análise filogenética das seqüências parciais do gene 16S rRNA das amostras R25 (novo isolado - KM203857) e R37 (*Mycoplasma haemomuris* - KM258432) e organismos relacionados. Árvore construída pelo método de Neighbor-Joining e valores percentuais de bootstrap.

A análise filogenética do isolado da amostra **R25** mostrou que esta pertencia ao grupo Haemofelis e forma um grupo irmão com o micoplasma descrito em *Micromys minutus* (KC863983 - não publicado - HORNOK et al., 2014). Dentre as seqüências intimamente relacionadas, encontram-se as descritas em capivaras por Vieira et al. (2009), além dos hemoplasmas *Mycoplasma coccoides* (AY171918) e '*Candidatus*

Mycoplasma turicensis' (DQ464423), descritos em roedores e felídeos, respectivamente. A árvore filogenética construída sugere a possibilidade de que estes hemoplasmas tenham um ancestral comum.

6 DISCUSSÃO

Como esperado, encontramos um alto percentual de ratazanas infectadas (31/43) por micoplasmas hemotrópicos dentre os grupos de ratazanas capturadas no Passeio Público e Zoológico de Curitiba. Um percentual similar ao encontrado em capivaras de vida livre por Vieira *et al.* (2009). Esta é a primeira vez que se descreve a frequência de infecção por micoplasmas hemotrópicos em ratazanas de vida livre no Brasil e caracteriza-se a espécie envolvida na infecção. Praticamente todas as amostras que foram submetidas a sequenciamento neste estudo estavam infectadas pelo *Mycoplasma haemomuris*, microrganismo conhecido por infectar roedores selvagens e de laboratório (FORD; MURRAY, 1959).

Em estudos com felinos de vida livre de três continentes apresentaram maior frequência de infecção por micoplasmas hemotrópicos do que os felinos silvestres de cativeiro (WILLI *et al.*, 2007b), assim como capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) de vida livre (80%) apresentaram maior ocorrência de infecção do que as de cativeiro (20%) (VIEIRA *et al.*, 2009). Animais de vida livre apresentam maior risco de infecção por hemoplasmas por estarem mais expostos a artrópodes hematófagos, além de terem maior atividade de luta e/ou comportamento agressivo do que animais domésticos ou mantidos em cativeiro (WILLI *et al.*, 2007b). Animais domésticos com acesso ao exterior, também apresentam maior risco de infecção (WILLI *et al.*, 2006; ROURA *et al.*, 2010). Neste contexto, as ratazanas capturadas neste estudo se encaixam em um grupo de risco para a infecção por micoplasmas hemotrópicos, pelo seu comportamento e provável contato com vetores artrópodes hematófagos.

Apesar de não terem sido detectadas no presente estudo diferenças significativas entre o sexo e o peso das ratazanas infectadas, tais características são consideradas fatores de risco para a infecção por hemoplasmas em gatos domésticos, por exemplo, com acesso a rua (TANAHARA *et al.*, 2010). Gatos machos, mais velhos e com histórico de brigas apresentaram um índice maior de infecção (SANTOS *et al.*, 2014). Esta reflexão poderia ser extrapolada para ratazanas de vida livre devido ao seu comportamento e habitat.

As diferenças de peso corporal entre as ratazanas infectadas e não infectadas, pode significar uma predisposição a infecção em animais mais velhos. Principalmente entre as ratazanas capturadas no Zoológico de Curitiba, o peso corporal das

ratazanas que não apresentaram infecção foi discretamente menor do que as que estavam infectadas. Apesar de não estatisticamente significativa para esta variável entre os grupos, essa leve diferença pode significar uma maior predisposição aos animais mais velhos a se infectarem. Contudo, um estudo mais abrangente com um número maior de animais precisaria ser realizado para confirmar essa suspeita.

A possibilidade de infecção clinicamente inaparente por micoplasmas hemotrópicos e a ausência de sinais clínicos parece semelhante ao encontrado neste estudo (BAKER et al., 1998, FIRMINO, 2008). Não houve diferença significativa entre as variáveis hematológicas estudadas, incluindo o hematócrito, entre as ratazanas infectadas e não infectadas. É possível especular que estes animais, até mesmo por serem portadores conhecidos de uma gama de microrganismos patogênicos e vetores de uma série de outros, possam estar devidamente adaptados à presença destes, assim como de micoplasmas hemotrópicos em seu organismo, não apresentando alterações hematológicas em relação à infecção.

Os resultados encontrados sugerem um baixo potencial patogênico da espécie *Mycoplasma haemomuris*. É fundamental a determinação da espécie de hemoplasma envolvido, já que a patogenicidade difere entre os vários hemoplasmas já descritos. Além disso, embora possa não ocasionar sinais clínicos ou alterações hematológicas em alguns animais, há o risco da disseminação do microrganismo para outros animais suscetíveis.

Apesar do desenvolvimento de ensaios de PCR quantitativo de elevada sensibilidade (BARKER et al., 2010; NISHIZAWA et al., 2010), a análise microscópica de esfregaços de sangue periférico corados com corantes do tipo Romanowsky ainda é o método mais utilizado na detecção de micoplasmas hemotrópicos em muitos laboratórios (BERENT et al., 1998, WESTFALL et al., 2001, TASKER et al., 2010a). A técnica utilizada para a detecção por microscopia óptica no presente estudo se baseou na contagem de 1000 células para cada animal amostrado e não foi capaz de demonstrar diferença significativa entre o número de células que apresentavam estruturas compatíveis com hemoplasmas entre os animais infectados e não infectados. A ausência de relação entre infecção e microscopia, corrobora o caráter transitório da infecção por micoplasmas hemotrópicos, e vai ao encontro dos relatos anteriores que descrevem a baixa sensibilidade desta técnica diagnóstica (BERENT et al., 1998; FOLEY et al., 1998; WESTFALL et al., 2001).

A presença de uma espécie diferente do *M. haemomuris* entre as amostras positivas nesse estudo sugere que exista diversidade na população de micoplasmas hemotrópicos infectando ratazanas de vida livre no Brasil. A similaridade entre esta espécie com o hemoplasma felino '*C. M. turicensis*' e a distância filogenética do *M. haemomuris*, sugere se tratar de uma nova espécie. Com apenas 94% de homologia com o '*C. M. turicensis*', a sequência relatada aqui pode ser considerada pertencente uma espécie diferente de hemoplasma (DRANCOURT; RAOULT, 2005). As sequências do gene 16S rRNA são amplamente utilizadas em microbiologia para a identificação de microrganismos incultiváveis como novas espécies (HANAGE et al., 2006) e as sequências do gene 16S rRNA também tem sido a base para a reclassificação das espécies de micoplasmas hemotrópicos (NEIMARK et al., 2001; 2002).

Alguns autores já propuseram que roedores pudessem representar reservatórios de hemoplasmas de felinos devido a essa estreita semelhança entre as espécies (WILLI et al. 2005), porém, tal hipótese ainda não foi confirmada. A íntima relação entre o '*C. M. turicensis*' e os hemoplasmas que infectam roedores sugere uma possível transmissão interespecífica desses agentes (WILLI et al., 2006c; SYKES et al., 2007). Por causa do estilo de vida das ratazanas de vida livre, que podem viver em quase todos os ambientes onde gatos e outros roedores estão presentes, e de acordo com os principais modos de transmissão para a infecção por hemoplasmas entre os animais e seres humanos, através picadas de vetores hematófagos artrópodes, espécies de roedores hospedeiros, em especial os sinantrópicos, como as ratazanas, podem ser consideradas como um potencial reservatório de '*C. M. turicensis*'. Contudo, esta hipótese carece de confirmação.

A sequência parcial obtida para o fragmento do gene 16S rRNA dessa nova espécie encontrada neste estudo foi 98% homóloga a uma sequência depositada no Genbank® e isolada de um hemoplasma presente no sangue de um rato de colheita (*Micromys minutus*), um pequeno roedor nativo da Ásia e Europa, restrito a regiões do sul da Inglaterra na Grã-Bretanha e zonas costeiras do País de Gales. Há também um número de populações dispersas, que são o resultado de introdução (MACDONNALD; TATTERSALL, 2001). É provável que ambos os isolados façam parte de uma mesma espécie, ainda não descrita. Porém, análises mais completas, da totalidade do gene 16S rRNA e de outras regiões do genoma devem ser realizadas

para melhor elucidar a relação entre esses isolados. A relevância clínica e epidemiológica deste novo isolado permanecem incertas.

O rato de colheita é o menor roedor da Europa, pesando até 6 g. É uma espécie facilmente identificada, de pele marrom-dourado, e o único roedor britânico que possui uma cauda preênsil (LEACH, 1990). Ratos de colheita são mais ativos durante a tarde e noite e são escaladores adeptos, que se alimentam de sementes de capim, cereais, frutos, insetos, frutas e os brotos de gramíneas (MACDONNALD; TATTERSALL, 2001). A relevância da presença de uma nova espécie de micoplasma hemotrópico infectando essas duas espécies diferentes de roedores de vida livre, com comportamentos biológicos distintos, em continentes tão distantes é incerta.

As ratazanas do Criatório do Passeio Público, utilizadas exclusivamente na alimentação dos animais carnívoros do acervo do parque, foram utilizadas como medida de acessar o status de saúde das mesmas e como controle negativo deste estudo. A presença da infecção por micoplasmas hemotrópicos nestes animais, e a ausência de diferença estatisticamente significativa entre o percentual de infecção entre estas e as ratazanas de vida livre capturadas, sugere a ubiquidade destes microrganismos. Apesar de serem mantidos em um criatório, e apenas por um curto espaço de tempo, não foi possível rastrear a fonte da infecção neste estudo. Estes animais são provenientes de um biotério convencional, onde não há controle específico para micoplasmas hemotrópicos e onde não são usadas técnicas moleculares para o seu diagnóstico. Portanto, não há como garantir que os animais do biotério de origem não sejam infectados com micoplasmas hemotrópicos. Por se tratar de um biotério convencional, o controle de agentes infecciosos não é conhecido e, portanto, pesquisadores que utilizem animais de biotérios dessa categoria devem estar cientes das implicações. Como os micoplasmas hemotrópicos podem ser prontamente transmitidos de roedores infectados através da inoculação de sangue, ou tecidos contendo sangue, essa potencial fonte de erro em pesquisas deve ser eliminada das colônias de roedores utilizados em projetos experimentais (GLEDHILL et al., 1965).

Diversas espécies de animais domésticas e selvagens do Brasil já tiveram infecção por micoplasmas hemotrópicos relatada (BIONDO et al., 2009). Estudos devem ser conduzidos para que se estabeleçam reservatórios, hospedeiros e novas espécies de micoplasmas hemotrópicos no país. A ocorrência destes organismos em roedores de vida livre em locais onde animais são mantidos em cativeiro, como no

Passeio Público e no Zoológico de Curitiba, pode significar risco de transmissão para os mesmos, e os roedores podem atuar como reservatórios perpetuando a presença da bactéria no local. Estratégias de controle de roedores sinantrópicos nesses locais devem ser tomadas para que se assegure a integridade da saúde dos animais do acervo dos parques, assim como dos seus funcionários e visitantes. Funcionários dos parques podem configurar uma população superexposta a estes agentes e, portanto, em maior risco de infecção cruzada entre espécies (YANG et al., 2000).

Infecções por micoplasmas hemotrópicos já foram descritas em uma variedade de roedores selvagens e de laboratório (RIKIHISA et al., 1997; NEIMARK et al., 2001; ZHANG; RIKIHISA, 2002; NEIMARK et al., 2005). Porém, a prevalência de infecções por hemoplasmas em roedores de vida livre ainda não foi documentada, com exceção do estudo de Willi et al. (2007c), que descobriu que 53% das amostras de sangue de camundongos *Apodemus* de vida livre na Suíça eram positivas por PCR para *M. coccoides*. De maneira geral, hospedeiros, transmissão, e características moleculares destes microrganismos são desconhecidos (ZHANG; RIKIHISA, 2002). O presente estudo tem como ponto importante identificar que o micoplasma hemotrópico *M. haemomuris* está presente nos roedores de vida livre em Curitiba. Trata-se de uma informação preliminar que permite levar ao desenvolvimento de outras pesquisas nessa área.

Estudos relacionados aos micoplasmas hemotrópicos estão se tornando cada vez mais frequentes no Brasil. Porém, não são suficientes para determinar a relevância dos hemoplasmas como agentes infecciosos importantes no país. Pesquisas futuras devem ser conduzidas para que se conheça seu impacto clínico e epidemiológico em animais silvestres, de companhia, de produção e laboratório, assim como seu papel como agente zoonótico, particularmente em pacientes superexpostos (YANG et al., 2000, CONGBIN et al., 2010) ou imunocomprometidos (SANTOS et al., 2008b, SYKES et al., 2010b). A determinação do genoma completo do *M. haemomuris* e o possível desenvolvimento de um modelo experimental *in vivo* da infecção por este patógeno, além de estudos epidemiológicos que determinem o impacto da infecção, são estudos em planejamento pelo nosso grupo de pesquisa.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao conhecimento dos autores, esta é a primeira vez que um estudo como este é conduzido no Brasil utilizando técnicas de PCR quantitativo e o primeiro com identificação de DNA de hemoplasmas em ratazanas no Brasil. Pode ser considerado um estudo preliminar, que determina a presença do *Mycoplasma haemomuris* em mais de 63% das ratazanas de vida livre e mantidas no criatório no Passeio Público de Curitiba. Estes achados sugerem que hemoplasmas possivelmente são endêmicos na região, e a epidemiologia deste microrganismo precisa ser investigada, assim como seu impacto na fauna local e nos animais selvagens e de cativeiro dos parques.

A ausência de alterações estatisticamente significativas nos parâmetros hematológicos entre as ratazanas infectadas e não infectadas corrobora o caráter de baixa patogenicidade e/ou infecção silenciosa destes microrganismos. Desta forma, alerta-se para a presença de hemoplasmas em animais utilizados em estudos experimentais e reitera-se a necessidade de investigação e controle desses microrganismos em colônias de animais de laboratório, principalmente.

A presença de uma espécie nova, ainda não descrita, e cuja sequência parcial do gene 16S rRNA foi homóloga a sequência isolada de um pequeno roedor da Europa alerta para a possibilidade de que haja mais espécies de micoplasmas hemotrópicos ainda não descritos. A investigação dessa variedade de espécies e seu impacto epidemiológico precisam ser mais bem investigados, tendo em vista o potencial zoonótico desses microrganismos.

Além da necessidade de métodos diagnósticos mais acessíveis, o estudo das formas de transmissão dos hemoplasmas se faz necessário para que métodos de prevenção possam ser estabelecidos. Os vetores devem ser mais bem identificados e combatidos. Da mesma forma, medidas de proteção individual devem ser adotadas, já que estes microrganismos estão comprovadamente relacionados a processos patológicos em seres humanos.

O desenvolvimento de modelos experimental *in vivo* para a infecção por *Mycoplasma haemomuris* pode ser uma etapa além na linha de pesquisa com micoplasmas hemotrópicos, tendo em vista que o cultivo *in vitro* destes microrganismos ainda não foi realizado com sucesso. Além disso, a determinação do genoma completo dessa espécie ainda não foi descrita e certamente auxiliaria na

predição das rotas envolvidas no metabolismo deste hemoplasma, na confecção de possíveis meios de cultura para o mesmo e na aplicação da infecção como modelo experimental. À medida que continuamos a examinar essas estratégias e os componentes moleculares envolvidos, os *insights* fornecidos nos permitirão compreender melhor o sucesso destes microrganismos extraordinários como patógenos e apreciar a importante posição que ocupam entre as bactérias patogênicas.

REFERÊNCIAS

- ADLER, S. The results of splenectomy in white mice as indicated by their reaction to *Bartonella muris*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n. 1, p. 75-80, 1930.
- AIKAWA, M.; NUSSENSWEIG, R. Fine structure of *Haemobartonella* sp. in the squirrel monkey. **The Journal of Parasitology**, v. 58, n.3, p. 628-630, 1972.
- ALMY, F.S., LADD, S.M., SPONENBERG, D.P., CRISMAN, M.V., MESSICK, J.B. *Mycoplasma haemolamae* infection in a 4-day-old cria: Support for in utero transmission by use of a polymerase chain reaction assay. **Canadian Veterinary Journal**, v. 47, n. 3, p. 229-233, 2006.
- AMSTISLAVSKY, S.Y., IGONINA, T.N., ROZHKOVA, I.N., BRUSENTSEV, E.Y., ROGOVAYA, A.A., RAGAEVA, D.S., NAPRIMEROV, V.A., LITVINOVA, E.A., PLYUSNINA, I.F., MARKEL, A.L. Rederivation by Embryo Transfer in Strains of Laboratory Mice and Rats. **Russian Journal of Genetics: Applied Research**, v. 3, n. 4, p. 305-315, 2013.
- ANDRADE JR., H. F. de; LAURENTI, M. D.; GOTO, H.; DUARTE, M. I. S.; CORBETT, C. E. P. Malária experimental: contaminação de cepas e animais de biotério por *Eperythrozoon coccoides*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 246-252, 1986.
- ANZIANI, O.S., TARABLA, H.D., FORD, C.A. *Eperythrozoon teganodes* infection in splenectomized calves in the province of Santa Fe, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 14, n. 1, p. 37-40, 1982.
- ARTWOHL, J.E., PURCELL, J.E., FORTMAN, D. The Use of Cross-Foster Rederivation to Eliminate Murine Norovirus, *Helicobacter* spp., and Murine Hepatitis Virus From a Mouse Colony. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 47, n. 6, p. 19-24, 2008.
- AUSTERMAN, J. W. Haemobartonellosis in a nonsplenectomized dog. **Veterinary Medicine, Small Animal Clinician**, v. 74, n.7, p. 954, 1979.
- BAKER, H.J., CASSELL, G.H., LINDSEY, J.R. Research Complications Due to *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* Infections in Experimental Animals. **American Journal of Pathology**, v. 64, n. 3, p. 625-657, 1971.
- BARKER, E.N., TASKER, S., DAY, M.J., WARMAN, S.M., WOOLLEY, K., BIRTLES, R., GEORGES, K.C., EZEOKOLI, C.D., NEWAJ-FYZUL, A., CAMPBELL, M.D., SPARAGANO, O.A.E., CLEAVELAND, S., HELPS, C.R. Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and 'Candidatus *Mycoplasma haematoparvum*' in dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 1-2, p. 167-170, 2010.

BARKER, E.N., DARBY, A.C., HELPS, C.R., PETERS, I.R., HEESOM, K.J., ARTHUR, C.J., CROSSETT, B., HUGHES, M.A., RADFORD, A.D., TASKER, S. Molecular characterization of the uncultivable hemotropic bacterium *Mycoplasma haemofelis*. **Veterinary Research**, v. 42, n. 83, 2011a.

BARKER, E.N.; HELPS, C.R.; NEIMARK, H.; PETERS, I.R.; PETERS, W.; TASKER, S. A novel haemoplasma species identified in archived primate blood smears. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 3-4, p. 478-481, 2011b.

BARKER, E.N., DARBY, A.C., HELPS, C.R., PETERS, I.R., HUGHES, M.A., RADFORD, A.D., NOVACCO, M., BORETTI, F.S., HOFMANN-LEHMANN, R., TASKER, S. Genome sequence for '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' a low-pathogenicity hemoplasma species. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 4, p. 905-906, 2012.

BARTLETT, R., PEASE, P. Latent *Haemobartonella muris* infection: its transmission and decline in an inbred, ectoparasite-free strain of Wistar rat. **Parasitology**, v. 71, n. 1, p. 35-40, 1975.

BENSON, D.A., CAVANAUGH, M., CLARK, K., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D.J., OSTELL, J., SAYERS, E.W. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, 2013.

BERENT, L.M., MESSICK, J.B., COOPER, S.K. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 10, p. 1215-1220, 1998.

BERGER, H., LINKENHEIMER, W.H. Activation of *Bartonella muris* infection in X-irradiated rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 109, p. 271-273, 1962.

BERKENKAMP, S.D., WESCOTT, R.B. Arthropod Transmission of *Eperythrozoon coccoides* in Mice. **Laboratory Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 398-401, 1988.

BIONDO, A.W.; DOS SANTOS, A.P.; GUIMARÃES, A.M.; VIEIRA, R.F.; VIDOTTO, O.; MACIEIRA, D.B.; ALMOSNY, N.R.; MOLENTO, M.B.; TIMENETSKY, J.; DE MORAIS, H.A.; GONZÁLEZ, F.H.; MESSICK, J.B. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 1-7, 2009.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Saneamento**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 2006. 4. ed. ver. 408 p.

BRUYNOGHE, R., VASSILIADIS, P. Contribution a l'etude des eperythrozoaires coccoides. **Annales de Parasitologie Paris**, v. 7, p. 353-364, 1929.

BURKHARD, M.J., GARRY, F. Artifactual hypoglycemia associated with hemotrophic mycoplasma infection in a lamb. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 4, p. 244-248, 2004.

CABELLO, J., ALTET, L., NAPOLITANO, C., SASTRE, N., HIDALGO, E., DÁVILA, J.A., MILLÁN, J. Survey of infectious agents in the endangered Darwin's fox (*Lycalopex fulvipes*): High prevalence and diversity of hemotrophic mycoplasmas. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3-4, p. 448-454, 2013.

CHU, Y., WONG, C., CHU, M., CHEUNG, C.P.F, CHEUNG, T.K.M., TSE, C., LUK, W., LO, J.Y.C. Outbreaks of Hemotrophic Mycoplasma Infections in China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1139-1140, 2009.

CONGBIN, Y.; AIBIN, L.; CONGLI, Y.; JUAN, X.; LANJUN, B.; WEIPING, Z.; ZHIBIAO, Y.; XIUGUO, H. Overexpression of complement receptor type I (CR1, CD35) on erythrocytes in patients with hemoplasma infection. **Microbiology and Immunology**, v. 54, n. 8, p. 460-465, 2010.

CONTAMIN, H., MICHEL, J-C. Haemobartonellosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*): Antagonism between *Haemobartonella* sp. and experimental *Plasmodium falciparum* malaria. **Experimental Parasitology**, v. 91, n.4, p. 297–305, 1999.

DEAN, R.S., HELPS, C.R., JONES, T.J.G., TASKER, S. Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, n.4, p. 413-417, 2008.

DESHUILLERS, P.L., SANTOS, A.P., NASCIMENTO, N.C., HAMPEL J.A., BERGIN, I.L., DYSON, M.C., MESSICK, J.B. Complete Genome Sequence of *Mycoplasma ovis* Strain Michigan, a Hemoplasma of Sheep with Two Distinct 16S rRNA Genes. **Genome Announcements**, v. 2, n. 1, 2014.

DIECKMANN, S.M., HOELZLE, K., DIECKMANN, M.P., STRAUBE, I., HOFMANN-LEHMANN, R., HOELZLE, L.E. Occurrence of hemotrophic mycoplasmas in horses with correlation to hematological findings. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 1-2, p. 43-52, 2012.

DILLBERGER, J.E., LOUDY, D.E.; ADLER, R.R.; GASS, J.H. Hemobartonella-like parasites in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 3, p. 301-307, 1994.

DINGER, J.E. Näheres über das *Eperythrozoon coccoides*. **Zentralbl Bakteriol**, v. 113, p. 503–510, 1929.

DOWERS, K.L., TASKER, S., RADECKI, S.V., LAPPIN, M.R. Use of pradofloxacin to treat experimentally induced *Mycoplasma hemofelis* infection in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 1, p. 105-111, 2009.

DRANCOURT, M., RAOULT, D. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4311-4315, 2005.

DUARTE, M.I.S., OLIVEIRA, M.S., SHIKANAI-YASUDA, M.A., MARIANO, O.N., TAKAKURA, C.F.H., PAGLIARI, C., CORBETT, C.E.P. *Haemobartonella*-Like Microorganism Infection in AIDS Patients: Ultrastructural Pathology, **The Journal of Infectious Diseases**, v. 165, n. 5, p. 976-977, 1992.

ELIOT, C.P., FORD, W.W. *Eperythrozoon coccoides* in mice. **American Journal of Epideiology**, v. 12, p. 677-680, 1930.

ELIOT, C.P. The Insect Vector for the Natural Transmission of *Eperythrozoon Coccoides* in Mice. **Science**, v. 84, n. 2183, p. 397, 1936.

EWERS, W.H. *Eperythrozoon mariboi* sp. nov., (Protozoa: order Richettsiales) a parasite of red blood cells of the flying fox *Pteropus macrotis* epularius in New Guinea. **Parasitology**, v. 63, n. 2, p. 261-269, 1971.

FELDER, K.M., HOELZLE, K., RITZMANN, M., KILCHLING, T., SCHIELE, D., HEINRITZI, K., GROEBEL, K., HOELZLE, L.E. Hemotrophic Mycoplasmas Induce Programmed Cell Death in Red Blood Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 557-564, 2011.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FERREIRA J.B., YAMAGUTI, M., MARQUES, L.M., OLIVEIRA, R.C., NETO, R.L., BUZINHANI, M., TIMENETSKY, J. Detection of *Mycoplasma pulmonis* in Laboratory Rats and Technicians. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n. 5, p. 229-234, 2008.

FIRMINO, F. de P. **Estudo da infecção por hemoplasmas em felinos domésticos do Distrito Federal**. 67f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

FOLEY, J.E.; HARRUS, S.; POLAND, A.; CHOMEL, B.; PEDERSEN, N.C. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 12, p. 1581-1588, 1998.

FOLEY, J.E.; PEDERSEN, N.C. '*Candidatus* Mycoplasma haemominutum', a low-virulence eperythrocytic parasite of cats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 815-817, 2001.

FORD, A.C., MURRAY, T.J. Studies on *Haemobartonella* infection in the rat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 5, p. 345-350, 1959.

FRERICHS, W.M., HOLBROOK, A.A. *Haemobartonella procyni* sp. in the raccoon, *Procyon lotor*. **Journal of Parasitology**, v. 57, n. 6, p. 1309-1310, 1971.

GIROTTTO, A., ZANGIRÓLAMO, A.F., BOGADO, A.L.G., SOUZA, A.S.L., da SILVA, G.C.F., GARCIA, J.L., VILAS BOAS, L.A., BIONDO, A.W., VIDOTTO, O. Molecular detection and occurrence of 'Candidatus Mycoplasma haemobos' in dairy cattle of Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n. 3, p. 342-344, 2012.

GLASGOW, L.A., ODUGBEMI, T., DWYER, P., RITTERSON, A.L. *Eperythrozoon coccoides*. I. Effect on the interferon response in mice. **Infection and Immunity**, v. 4, n. 4, p. 425-430, 1971.

GLASGOW, L.A., MURRER, A.T., LOMBARDI, P.S. *Eperythrozoon coccoides* II. Effect on Interferon Production and Role of Humoral Antibody in Host Resistance. **Infection and Immunity**, v. 9, n. 2, p. 266-272, 1974.

GLEDHILL, A.W., NIVEN, J.S.F. The toxicity of some bacterial filtrates for mice pre-infected with *Eperythrozoon coccoides*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 38, n. 3, p. 284-290, 1957.

GLEDHILL, A.W., NIVEN, J.S., SEAMER, J. Elimination of *Eperythrozoon coccoides* infection from mouse colonies. **The Journal of Hygiene**, v. 63, p. 73-78, 1965.

GRAZZIOTIN, A.L.; SANTOS, A.P.; GUIMARÃES, A.M.; MOHAMED, A.; CUBAS, Z. S.; OLIVEIRA, M.J.; SANTOS, L.C.; MORAES, W.; VIEIRA, R.F.; DONATTI, L.; BARROS FILHO, I.R.; BIONDO, A.W.; MESSICK, J.B. *Mycoplasma ovis* in captive cervids: prevalence, molecular characterization and phylogeny. **Veterinary Microbiology**, v. 152, n. 3-4, p. 415-419, 2011.

GUIMARÃES, A.M.S., JAVOROUSKI, M.L., BONAT, M., LACERDA, O., BALBINOTTI, B., QUEIROZ, L.G.P.B., TIMENETSKY, J., BIONDO, A.W., MESSICK, J.B. Molecular detection of 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in a lion (*Panthera leo*) from a Brazilian zoological garden. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 3, p. 195-196, 2007.

GUIMARÃES, A.M.S. **Detecção de micoplasmas, bartonelas e vírus da leucemia felina em pequenos felídeos neotropicais mantidos em cativeiro no Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu**. 129f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GUIMARÃES, A.M.S., VIEIRA, R.F.C., POLETTO, R., VEMULAPALLI, R., SANTOS, A.P., MORAES, W., CUBAS, Z.S., SANTOS, L.C., MARCHANT-FORDE J.N., TIMENETSKY, J., BIONDO, A.W., MESSICK, J.B. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 417-425, 2011a.

GUIMARÃES, A.M., SANTOS, A.P., SANMIGUEL, P., WALTER, T., TIMENETSKY, J., MESSICK, J.B. Complete genome sequence of *Mycoplasma suis* and insights into its biology and adaption to an erythrocyte niche. **PloS One**, v. 6, n. 5, 2011b.

GUIMARÃES, A.M., TOTH, B., SANTOS, A.P., NASCIMENTO, N.C., KRITCHEVSKY, J.E., MESSICK, J.B. Genome sequence of 'Candidatus Mycoplasma haemolamae'

strain purdue, a red blood cell pathogen of alpacas (*Vicugna pacos*) and llamas (*Lama glama*). **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 22, p. 6312-6313, 2012.

GUIMARÃES, A.M., SANTOS, A.P., NASCIMENTO, N.C., TIMENETSKY, J., MESSICK, J.B. Comparative genomics and phylogenomics of hemotrophic mycoplasmas. **PloS One**, v. 9, n. 3, 2014.

HAMPEL, J.A., SPATH, S.N., BERGIN, I.L., LIM, A., BOLIN, S.R., DYSON, M.C. Prevalence and Diagnosis of Hemotrophic Mycoplasma Infection in Research Sheep and Its Effects on Hematology Variables and Erythrocyte Membrane Fragility. **Comparative Medicine**, v. 64, n. 6, p. 478-485, 2014.

HANAGE, W. P.; FRASER, C.; SPRATT, B. G. Sequences, sequence clusters and bacterial species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Série B – Biological Science**, v. 361, p. 1917-1927, 2006.

HARAWASA, R., KAWAHARA M., RIKIHISA, Y. Characteristics of the 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region of *Mycoplasma haemomuris*, Previously Classified as '*Haemobartonella muris*'. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 12, p. 1161–1164, 2002.

HARASAWA, R., ORUSA, R., GIANGASPERO, M. Molecular Evidence for Hemotropic Mycoplasma Infection in a Japanese Badger (*Meles meles anakuma*) and a Raccoon Dog (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 50, n. 2, p. 412-415, 2014.

HARVEY, J.W., GASKIN, J.M. Experimental feline haemobartonellosis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 13, n. 1, p. 28-38, 1977.

HIRATA, M., TATENO, M., SAKUMA, M., NAKANISHI, N., IZAWA, M., ASARI, Y., OKAMURA, M., MIYAMA, T.S., SETOGUCHI, A., ENDO, Y. An epidemiological survey of hemoplasma infection in Iriomote cats (*Prionailurus bengalensis iriomotensis*). **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.74, n. 12, p. 1531-1537, 2012.

HOELZLE, L.E. Significance of haemotrophic mycoplasmas in veterinary medicine with particular regard to the *Mycoplasma suis* infection in swine. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**, v. 120, n. 1-2, p. 34-41, 2007.

HOELZLE, L.E. Haemotrophic mycoplasmas: Recent advances in *Mycoplasma suis*. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 3-4, p. 215-226, 2008.

HOELZLE, K., WINKLER, M., KRAMER, M.M., WITTENBRINK, M.M., DIECMANN, S.M., HOELZLE, L.E. Detection of *Candidatus* Mycoplasma haemobos in cattle with anaemia. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 3, p. 408-410, 2011.

HOLT, J.G., et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9^a Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HORNOK, S., MELI, M.L., PERRETEEN, A., FARKAS, R., WILLI, B., BEUGNET, F., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Molecular investigation of hard ticks (Acari:

Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 1-2, p. 98–104, 2010.

HORNOK, S., MELI, M.L., HOFMANN-LEHMANN, R. **New haemoplasma from *Micromys minutus***. No prelo.

HSU, D.Y., GEIMAN, Q.M. Synergistic effect of *Haemobartonella muris* on *Plasmodium berghei* in white rats. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, n. 5, p. 747-760, 1952.

HU, Z.; YIN, J.; SHEN, K.; KANG, W.; CHEN, Q. Outbreaks of hemotropic mycoplasma infections in China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1139-1140, 2009.

HULME-MOIR, K.L., BARKER, E.N., STONELAKE, A., HELPS, C.R., TASKER, S. Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor antibiotic therapy in a dog with naturally acquired *Mycoplasma haemocanis* infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 4, p. 582-587, 2010.

IRALU, V., GANONG, K.D. Agglutination of Mouse Erythrocytes by *Eperythrozoon coccoides*. **Infection and Immunity**, v. 39, n. 2, p. 963-965, 1982.

ISHAK, A.M., DOWERS, K.L., CAVANAUGH, M.T., POWELL, C.C., HAWLEY, J.R., RADECKI, S.V., LAPPIN, M.R. Marbofloxacin for the Treatment of Experimentally Induced *Mycoplasma haemofelis* Infection in Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 2, p. 288-292, 2008.

ISO, T., SUZUKI, J., SASAOKA, F., SASHIDA, H., WATANABE, Y., FUJIHARA, M., NAGAI, K., HARASAWA, R. Hemotropic mycoplasma infection in wild black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 184-189, 2012.

JENSEN, W.A.; LAPPIN, M.R.; KAMKAR, S.; REAGAN, W.J. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 604-608, 2001.

KEMMING, G., MESSICK, J.B., MUELLER, W., ENDERS, G., MEISNER, F., MUENZING, S., KISCH-WEDEL, H., SCHROPP, A., WOJTCZYK, C., PACKERT, K., MESSMER, K., THEIN, E. Can we continue research in splenectomized dogs? *Mycoplasma haemocanis*: Old problem - New insight. **European Surgical Research**, v. 36, n. 4, p. 198-205, 2004a.

KEMMING, G.I, MESSICK, J.B., ENDERS, G., BOROS, M., LORENZ, B., MUENZING, S., KISCH-WEDEL, H., MUELLER, W., HAHMANN-MUELLER, A., MESSMER, K., THEIN, E. *Mycoplasma haemocanis* Infection — A Kennel Disease? **Comparative Medicine**, v. 54, n. 4, p. 404-409, 2004b.

KENNY, M.J.; SHAW, S.E.; BEUGNET, F.; TASKER, S. Demonstration of two distinct hemotropic mycoplasmas in French dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.

11, p. 5397-5399, 2004.

KIMURA MA. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.

KONG, H.H., GRICE, E.A., CONLAN, S., DEMING, C.B., FREEMAN, A.F., BEATSON, M., NOMICOS, E., YOUNG, A.C., BOUFFARD, G.G., BLAKESLEY, R.W., CANDOTTI, F., HOLLAND, S.M., MURRAY, P.R., GREEN, E.D., SEGRE, J.A. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. **Genome Research**, v. 22, n. 5, p. 850-859, 2012.

KORESSAAR, T., REMM, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. **Bioinformatics**, v. 23, n. 10, p. 1289-1291, 2007.

KREIER, J. P., RISTIC, M. (1984). Genus III *Haemobartonella*; genus IV *Eperythrozoon*. In KRIEG, N.R., HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, p. 724–729.

KRENGEL, A., MELI, M.L., CATTORI, V., WACHTER, B., WILLI, B., THALWITZER, S., MELZHEIMER, J., HOFER, H., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. First evidence of hemoplasma infection in free-ranging Namibian cheetahs (*Acinonyx jubatus*). **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2-4, p. 972-976, 2013.

KURTDEDE, A., URAL, K. Haemobartonellosis in Cats in Ankara, Turkey. **Acta Veterinaria Brno**, v. 73, p. 507-512, 2004.

LEACH, M. **Mice of the British Isles (Shire Natural History)**. 1.ed. Aylesbury: Inglaterra, 1990.

LJUNGSTRÖM, I., HULDT, G., VOLLER, A. The effect of *Eperythrozoon coccoides* infection on the number of plaque forming cells in mice. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B: Microbiology and Immunology**. v. 82, n. 6, p. 911-913, 1974.

MACDONNALD, D. W., TATTERSALL, F. T. **Britain's mammals - the challenge for conservation. The Wildlife Conservation research Unit**. 1.ed. Oxford: Oxford University, 2001

MAGGI, R.G., MASCARELLI, P.E., BALAKRISHNAN, N., ROHDE, C.M., KELLY, C.M., RAMAIAH, L., LEACH, M.W., BREITSCHWERDT, E.B. “*Candidatus Mycoplasma haemomacae*” and Bartonella quintana Bacteremia in Cynomolgus Monkeys. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1408-1411, 2013a.

MAGGI, R.G., COMPTON, S.M., TRULL, C.L., MASCARELLI, P.E. MOZAYENI, B.R., BREITSCHWERDT, E.B. Infection with hemotropic Mycoplasma sp. in people with and without extensive arthropod and animal contact. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 10, p. 3237-3241, 2013b.

MAGGI, R.G., MASCARELLI, P.E., HAVENGA, L.N., NAIDOO, V., BREITSCHWERDT, E.B. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 103, 2013c.

MARMORSTON, J. Effect of Splenectomy on a Latent Infection, *Eperythrozoon Coccoides*, in White Mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 56, n. 2, p. 142-142, 1935.

MASCARELLI, P.E., KEEL, M., YABSLEY, M., LAST, L.A., BREITSCHWERDT, E.B., MAGGI, R.G. Hemotropic mycoplasmas in little brown bats (*Myotis lucifugus*). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 717, 2014.

MASON, R.W., STATHAM, P. Susceptibility of sheep and goats to *Eperythrozoon ovis* infection. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, n. 3, p. 116–117, 1991.

MCLAUGHLIN, B.G., EVANS, C.N., MCLAUGHLIN, P.S. An *Eperythrozoon*-like parasite in llamas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197 n. 9, p. 1170-1175, 1990.

MELI, M.L., WILLI, B., DREHER, U.B., CATTORI, V., KNUBBEN-SCHWEIZER, G., NUSS, K., BRAUN, U., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, Molecular Characterization, and Occurrence of Two Bovine Hemoplasma Species in Swiss Cattle and Development of Real-Time TaqMan Quantitative PCR Assays for Diagnosis of Bovine Hemoplasma Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3563-3568, 2010.

MESSICK, J.B.; BERENT, L.M.; COOPER, S.K. Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 462-466, 1998.

MESSICK, J.B.; BERENT, L.M.; EHRHART, E.J.; WASMER, C.C. Light and electron microscopic features of eperythrozoon-like parasites in a North American opossum (*Didelphis virginiana*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 31, n. 2, p.240-243, 2000.

MESSICK, J.B.; WALKER, P.G.; RAPHEL, W.; BERENT, L.; SHI, X. '*Candidatus Mycoplasma haemodidelphis*' sp. nov., '*Candidatus Mycoplasma haemolamae*' sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 693-698, 2002.

MESSICK, J.B. New perspectives about hemotrophic mycoplasma (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practitioners**, v. 33, n. 6, p. 1453–1465, 2003.

MESSICK, J. B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 2-13, 2004.

MESSICK, J.B., SANTOS, A.P., GUIMARÃES, A.M. Complete genome sequences of two hemotropic mycoplasmas, *Mycoplasma haemofelis* strain Ohio2 and *Mycoplasma suis* Strain Illinois. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 8, p. 2068-2069, 2011.

MESSICK, J.B., SANTOS, A.P. Identification, Bioinformatics Analyses, and Expression of Immunoreactive Antigens of *Mycoplasma haemofelis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 8, p. 1275-1281, 2011.

MICHEL, J-C., THOISY, B., CONTAMIN, H. Chemotherapy of haemobartonellosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Journal of Medical Primatology**, v. 29, n. 2, p. 85-87, 2000.

MOLYNEUX, D.H. Relationship between *Eperythrozoon coccoides* and Trypanosoma (Trypanozoon) brucei brucei in experimentally infected mice. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 64, n. 3, p. 325-328, 1970.

MORAIS, H.A., GUIMARÃES, A.M.S., VIDOTTO, O., BAUMANN, A., BIONDO, A.W., MESSICK, J.B. Co-infection with *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in three cats from Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, n. 6, p. 518-520, 2007.

MURRAY, R.G.E., STACKEBRANDT, E. Taxonomic note: implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described procaryotes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, n. 1, p.186-187, 1995.

MUSEUX, K., BORETTI, F.S., WILLI, B., RIOND, B., HOELZLE, K., HOELZLE, L.E., WITTENBRINK, M.M., TASKER, S., WENGI, N., REUSCH, C.E., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. In vivo transmission studies of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' in the domestic cat. **Veterinary Research**, v. 40, n. 5, 2009.

NASCIMENTO, N.C., SANTOS, A.P., GUIMARÃES, A.M., SANMIGUEL, P.J., MESSICK, J.B. *Mycoplasma haemocanis* - the canine hemoplasma and its feline counterpart in the genomic era. **Veterinary Research**, v. 43, n. 66, 2012.

NASCIMENTO, N.C., SANTOS, A.P. CHU, Y., GUIMARÃES, A.M.S., PAGLIARO, A., MESSICK, J.B. Genome Sequence of *Mycoplasma parvum* (Formerly *Eperythrozoon parvum*), a Diminutive Hemoplasma of the Pig. **Genome Announcements**, v. 1, n. 6, 2013.

NCBI TAXONOMY - National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>>. Acesso em: 01/07/2014.

NEIMARK, H.; KOCAN, K. M. The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a *Mycoplasma*. **FEMS Microbiology Letters**, n. 156, n. 2, p. 287–291, 1997.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K-E; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of '*Candidatus Mycoplasma haemofelis*', '*Candidatus Mycoplasma haemomuris*', '*Candidatus Mycoplasma haemosuis*' and '*Candidatus Mycoplasma wenyonii*'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 891-899, 2001.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K-E; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 683, 2002a.

NEIMARK, H.; BARNAUD, A.; GOUNON, P.; MICHEL, J.C.; CONTAMIN, H. The putative haemobartonella that influences *Plasmodium falciparum* parasitaemia in squirrel monkeys is a haemotrophic mycoplasma. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 7, p. 693-698, 2002b.

NEIMARK, H.; HOFF, B.; GANTER, M. *Mycoplasma ovis* comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an epierythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 365-371, 2004.

NEIMARK, H.; PETERS, W.; ROBINSON, B. L.; STEWART, L. B. Phylogenetic analysis and description of *Eperythrozoon coccoides*, proposal transfer to the genus *Mycoplasma* as *Mycoplasma coccoides* comb. nov. and request for an opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 1385-1391, 2005.

NELSON, J.B. Acute hepatitis associated with mouse leukemia. IV. The relationship of *Eperythrozoon coccoides* to the hepatitis virus of Princeton mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 98, n. 3, p. 441-450, 1953.

NELSON, J.B. An ascites tumor appearing during the passage of *Eperythrozoon coccoides* in mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 103, n. 6, p. 743-752, 1956.

NISHIZAWA, I., SATO, M., FUJIHARA, M., SATO, S., HARASAWA, R. Differential Detection of Hemotropic Mycoplasma Species in Cattle by Melting Curve Analysis of PCR Products. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 1, p. 77-79, 2010.

NORTH, D. C. Fatal haemobartonellosis in a non-splenectomized dog - a case report. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 19, n. 12, p. 769-773, 1978.

NOVACCO, M., BORETTI, F.S., WOLF-JÄCKEL, G.A., RIOND, B., MELI, M.L., WILLI, B., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Chronic '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' infection. **Veterinary Research**, v. 42, n. 59, 2011.

OBARA, H.; FUJIHARA, M.; WATANABE, Y.; ONO, H.K.; HARASAWA, R.J. A feline hemoplasma, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', detected in dog in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n.6, p. 841-843, 2011.

OEHLERKING, J., KUBE, M., FELDER, K.M., MATTER, D., WITTENBRINK, M.M., SCHWARZENBACH, S., KRAMER, M.M., HOELZLE, K., HOELZLE, L.E. Complete genome sequence of the hemotrophic *Mycoplasma suis* strain KI3806. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 39, p. 2369-2370, 2011.

OTT, K.J., STAUBER, L.A. *Eperythrozoon coccoides*: Influence on Course of Infection of Plasmodium chabaudi in Mouse. **Science**, v. 155, n. 3769, p. 1546-1548, 1967.

OWEN, D.G. *Haemobartonella muris*: case report and investigation of transplacental transmission. **Laboratory Animals**, v. 16, n. 1, p. 17-19, 1982.

PETERS, W. Competitive Relationship between *Eperythrozoon coccoides* and *Plasmodium berghei* in the Mouse. **Experimental Parasitology**, v. 16, p. 158-166, 1965.

PETERS, W.; MOLYNEUX, D. H.; HOWELLS, R. E. *Eperythrozoon* and *Haemobartonella* in monkeys. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 68, n. 1, p. 47-50, 1974.

PITCHER, D.G.; NICHOLAS, R.A. Mycoplasma host specificity: fact or fiction? **Veterinary Journal**, v. 170, n. 3, p. 300-306, 2005.

PITORRI, F., DELL'ORCO, M., CARMICHAEL, N., BARKER, E.N., HOLLYWOOD, M., TASKER, S. Use of real-time quantitative PCR to document successful treatment of *Mycoplasma haemocanis* infection with doxycycline in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, n. 4, p. 493-496, 2012.

PRULLAGE, J.B., WILLIAMS, R.E., GAAFAR, S.M. On the transmissibility of *Eperythrozoon suis* by *Stomoxys calcitrans* and *Aedes aegypti*. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n. 1-2, p. 125-135, 1993.

REYNOLDS, C.A.; LAPPIN, M.R. 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' infections in 21 client-owned cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 43, n. 5, p. 249-257, 2007.

RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; WEN, B.; KOCIBA, G.; FUERST, P.; KAWAMORI, F.; SUTO, C.; SHIBATA, S.; FUTOHASHI, M. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 823-829, 1997.

ROSENGARTEN, R., CITTI, C., MUCH, P., SPERGSE, J., DROESSE, M., HEWICKER-TRAUTWEIN, M. The changing image of mycoplasmas: from innocent bystanders to emerging and reemerging pathogens in human and animal diseases. **Contributions to Microbiology**, v. 8, p. 166-185, 2001.

ROURA, X.; PETERS, I.R.; ALTET, L.; TABAR, M.D.; BARKER, E.N.; PLANELLAS, M.; HELPS, C.R.; FRANCINO, O.; SHAW, S.E.; TASKER, S. Prevalence of

hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 2, p. 270-274, 2010.

SAITOU N, NEI MI. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

SÁNCHEZ-PÉREZ, A., BROWN, G., MALIK, R., ASSINDER, S.J., CANTLON, K., GOTSIS, C., DUNBAR, S., FRASER, S. Rapid detection of haemotropic mycoplasma infection of feline erythrocytes using a novel flow cytometric approach. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 158, 2013.

SANTOS, A. P. **Infecção por hemoplasmas em felinos domésticos da região de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.** 2008. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SANTOS, A.P.; SANTOS, R.P.; BIONDO, A.W.; DORA, J.M.; GOLDANI, L.Z.; OLIVEIRA, S.T.; GUIMARÃES, A.M.S.; TIMENETSKY, J.; MORAIS, H.A.; GONZÁLEZ, F.H.; MESSICK, J.B. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n. 12, p. 1922-1924, 2008b.

SANTOS, A.P., MESSICK, J.B., BIONDO, A.W., OLIVEIRA S.T., PEDRALLI, V. LASTA, C.S., LACERDA, L.A., ESTEVES, V.S., HOFMANN-LEHMANN, R., WILLI, B., GONZÁLEZ, F.H.D. Design, optimization, and application of a conventional PCR assay with an internal control for detection of ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ 16S rDNA in domestic cats from Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p. 443-452, 2009.

SANTOS, A.P., GUIMARÃES, A.M., NASCIMENTO, N.C., SANMIGUEL, P.J., MARTIN, S.W., MESSICK, J.B. Genome of *Mycoplasma haemofelis*, unraveling its strategies for survival and persistence. **Veterinary Research**, v. 42, n.102, 2011.

SANTOS, A.P., GUIMARÃES, A.M., NASCIMENTO, N.C., SANMIGUEL, P.J., MESSICK, J.B. Complete genome sequence of *Mycoplasma wenyonii* strain Massachusetts. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 19, p. 5458-5459, 2012.

SANTOS, A.P., CONRADO, F.O., MESSICK, J.B., BIONDO, A.W., STEDILE, S.T.O., GUIMARAES, A.M.S., do NASCIMENTO, N.C., GONZALEZ, F.H.D. Hemoplasma frequency and hematological abnormalities associated with infection in three different cat populations from Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 4, p. 428-34, 2014.

SANTOS, L.C., CUBILLA, M.P., MORAES, W., CUBAS, Z.S., OLIVEIRA, M.J., ESTRADA, M., LEUTENEGGER, C.M., SYKES, J.E., LINDSAY, L.L., MARCONDES, M., BARROS FILHO, I.R., BIONDO, A.W. Hemotropic Mycoplasma in a Free-ranging Black Howler Monkey (*Alouatta caraya*) in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 3, p. 728-731, 2013.

SASAKI, M., OHTA, K., MATSUU, A., HIRATA, H., IKADAI, H., OYAMADA, T. A molecular survey of *Mycoplasma haemocanis* in dogs and foxes in Aomori Prefecture, Japan. **The Journal of Protozoology Research**, v. 18, n. 2, p. 57-60, 2008.

SASAOKA, F., SUZUKI J., WATANABE, Y., FUJIHARA, M., NAGAI, K., HIRATA, T., HARASAWA, R. Two Genotypes among '*Candidatus* Mycoplasma haemobos' Strains Based on the 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Sequences. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 3, p. 361-364, 2012.

SASHIDA, H., SASAOKA, F., SUZUKI, J., WATANABE, Y., FUJIHARA, M., NAGAI, K., KOBAYASHI, S., FURUHAMA, K., HARASAWA, R. Detection of Hemotropic Mycoplasmas in Free-living Brown Sewer Rats (*Rattus norvegicus*). **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 7, p. 979-983, 2013.

SASHIDA, H., SASAOKA, F., SUZUKI, J., FUJIHARA, M., NAGAI, K., FUJITA, H., KADOSAKA, T., ANDO, S., HARASAWA, R. Two Clusters among *Mycoplasma haemomuris* Strains, Defined by the 16S-23S rRNA Intergenic Transcribed Spacer Sequences. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 5, p. 643-648, 2013b.

SCHILLING, V. *Eperythrozoon coccoides*, eine neue durch Splenektomie aktivierbare Dauerinfektion der weissen Maus. **Journal of Molecular Medicine**. v.7, n. 39, p. 1853-1855, 1928.

SHARIFIYAZDI, H., NAZIFI, S., ASKI, H.S., SHAYEGH, H. Molecular characterization and phylogenetic analysis of the causative agent of hemoplasma infection in small Indian Mongoose (*Herpestes Javanicus*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 4, p. 243-247, 2014.

SPAULDING, S. R.; JACKSON, W. B., Field Methodology for Evaluating Rodenticide Efficacy. In: KAUKKINEN, D.E. **Vertebrate Pest Control and Management Materials: Fourth Symposium**. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1983, p. 183-198.

STEER, J.A.; TASKER, S.; BARKER, E.N.; JENSEN, J.; MITCHELL, J.; STOCKI, T.; CHALKER, V.J.; HAMON, M. A novel hemotropic mycoplasma (hemoplasma) in a patient with hemolytic anemia and pyrexia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 11, p.147- 151, 2011.

STOFFREGEN, W.C., ALT, D.P., PALMER, M.V., OLSEN, S.C., WATERS, W.R., STASKO, J.A. Identification of a haemomycoplasma species in anemic reindeer (*Rangifer tarandus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 2, p. 249-258, 2006.

SYKES, J.E.; BALL, L.M.; BAILIFF, N.L.; FRY, M.M. '*Candidatus* Mycoplasma haematoparvum', a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 27-30, 2005.

SYKES, J.E.; DRAZENOVICH, N.L.; BALL, L.M.; LEUTENEGGER, C.M. Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology

of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 4, p. 685–693, 2007.

SYKES, J.E. Feline hemotropic mycoplasmas. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 62-69, 2010a.

SYKES, J.E.; LINDSAY, L.L.; MAGGI, R.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Human co-infection with *Bartonella henselae* and two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3782-3785, 2010b.

SYKES, J.E. Feline hemotropic mycoplasmas. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, n. 6, p.1157-1170, 2010c.

SUTTON, R.H. *Eperythrozoon ovis*: the difference in carbohydrate metabolism between infected and uninfected sheep erythrocytes. **The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 54, n. 5, p. 449-458, 1976.

TAGAWA, M., MATSUMOTO, K., INOKUMA, H. Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*' in cattle in Hokkaido, Japan. **Veterinary Microbiology**, v.132, n. 1-2, p. 177-180, 2008.

TAGAWA, M., MATSUMOTO, K., YOKOYAMA, N., INOKUMA, H. Comparison of the Effect of Two Hemoplasma Species on Hematological Parameters in Cattle. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 1, p. 113-115, 2010.

TAGAWA, M., TAKEUCHI, T., FUJISAWA, T., KONNO, Y., YAMAMOTO, S., MATSUMOTO, K., YOKOYAMA, N., INOKUMA, H. A Clinical Case of Severe Anemia in a Sheep Coinfected with *Mycoplasma ovis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemovis*' in Hokkaido, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 2, p. 99-102, 2011.

TAGAWA, M., YAMAKAWA, K., AOKI, T., MATSUMOTO, K., ISHII, M., INOKUMA, H. Effect of Chronic Hemoplasma Infection on Cattle Productivity. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 10, p. 1271-1275, 2013.

TAMURA, K., NEI, M., KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 30, p. 11030-11035, 2004.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., AND KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TANAHARA, M., MIYAMOTO, S., NISHIO, T., YOSHII, Y., SAKUMA, M., SAKATA, Y., NISHIGAKI, K., TSUJIMOTO, H., SETOGUCHI, A., ENDO, Y. An Epidemiological Survey of Feline Hemoplasma Infection in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 12, p. 1575-1581, 2010.

TANAKA, H.; HALL, W.T.; SHEFFIELD, J.B.; MOORE, D.H. Fine structure of *Haemobartonella muris* as compared with *Eperythrozoon coccoides* and *Mycoplasma pulmonis*. **Journal of Bacteriology**, v. 90, n. 6, p. 1735- 1749, 1965.

TASKER, S.; HELPS, C.R.; BELFORD, C.J.; BIRTLES, R.J.; DAY, M.J.; SPARKES, A.H.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; HARBOUR, D.A. 16S rDNA comparison demonstrates near identity between an United Kingdom *Haemobartonella felis* strain and the American California strain. **Veterinary Microbiology**, v. 81, n. 1, p.73-78, 2001.

TASKER, S., LAPPIN, M.R. *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 4, n. 1, p. 3-11, 2002;

TASKER, S., PETERS, I.R., PAPASOULIOTIS, K., CUE, S.M., WILLI, B., HOFMANN-LEHMANN, R., GRUFFYDD-JONES, T., KNOWLES, T.G., DAY, M.J., HELPS, C.R. Description of outcomes of experimental infection with feline haemoplasmas: Copy numbers, haematology, Coombs' testing and blood glucose concentrations. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 3-4, p. 323-332, 2009.

TASKER, S. Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 5, p. 369-381, 2010.

TASKER, S.; PETERS, I.R.; MUMFORD, A.D.; DAY, M.J.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; DAY, S.; PRETORIUS, A.M.; BIRTLES, R.J.; HELPS, C.R.; NEIMARK, H. Investigation of human haemotropic *Mycoplasma* infections using a novel generic haemoplasma qPCR assay on blood samples and blood smears. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 1285-1292, 2010a.

THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

THURSTON, J.P. Anaemia in mice caused by *Eperythrozoon coccoides* (Schilling, 1928). **Parasitology**, v. 44, n. 1-2, p. 81-98, 1954.

TORNQUIST, S.J., BOEDER, L.J., PARKER, J.E., CEBRA, C.K., MESSICK, J.B. Use of a polymerase chain reaction assay to study the carrier state of infection with camelid *Mycoplasma haemolama*, formerly *Eperythrozoon* spp, infecting camelids. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 31, p. 153-154, 2002.

UILENBERG, G. *Eperythrozoon tuomii*, n.sp. (Rickettsiales), the 3rd species of *Eperythrozoon* of cattle in Madagascar. **Revue D'elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v. 20, n. 4, p. 563-569, 1967

UNTERGRASSER, A., CUTCUTACHE, I., KORESSAAR, T., YE, J., FAIRCLOTH, B.C., REMM, M., ROZEN, S.G., Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, e115, 2012.

VENABLE, J.H., EWING, S.A. Fine-Structure of *Haemobartonella canis* (Rickettsiales: Bartonellaceae) and Its Relation to the Host Erythrocyte. **The Journal of Parasitology**, v. 54, n. 2, p. 259-268, 1968.

VIEIRA, R.F.C., MOLENTO, M.B., dos SANTOS, L.C., MORAES, W., CUBAS, Z.S., SANTOS, A.P., GUIMARÃES, A.M.S., MOHAMED, A., BARROS FILHO, I.R., BIONDO, A.W., MESSICK, J.B. Detection of a novel hemoplasma based on 16S rRNA gene DNA in captive and free-ranging capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 3-4, p. 410-413, 2009.

VOLOKHOV, D.V., NORRIS, T., RIOS, C., DAVIDSON, M.K., MESSICK, J.B., GULLAND, F.M., CHIZHIKOV, V.E. Novel hemotrophic mycoplasma identified in naturally infected California sea lions (*Zalophus californianus*). **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 1-2, p. 262-268, 2011.

WATANABE, Y., FUJIHARA, M., OBARA, H., NAGAI, K., HARASAWA. Two Genetic Clusters in Swine Hemoplasmas Revealed by Analyses of the 16S rRNA and RNase P RNA Genes. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 12, p. 1657-1661, 2011.

WEINMAN, D. Infectious anaemias due to *Bartonella* and related red cell parasites. **Transactions of the American Philosophical Society**, v. 33, n. 3, p. 243, 1944.

WESTFALL, D.S., JENSEN, W.A., REAGAN, W.J., RADECKI, S.V., LAPPIN, M.R. Inoculation of two genotypes of *Hemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 5, p. 687-691, 2001.

WILLI, B., BORETTI, F.S., CATTORI, V., TASKER, S., MELI, M.L., REUSH, C., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2581-2585, 2005.

WILLI, B., BORETTI, F.S., BAUMGARTNER C., CATTORI, V., MELI, M.L., DOHERR, M.G., REUSCH, C.E., HOFMANN-LEHMANN, R. Feline hemoplasmas in Switzerland: identification of a novel species, diagnosis, prevalence, and clinical importance. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 148, n. 3, p. 139-140, 2006a.

WILLI, B.; BORETTI, F.S.; BAUMGARTNER, C.; TASKER, S.; WENGER, B.; CATTORI, V.; MELI, M.L.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 961-969, 2006b.

WILLI, B.; TASKER, S.; BORETTI, F.S.; DOHERR, M.G.; CATTORI, V.; MELI, M.L.; LOBETTI, R.G.; MALIK, R.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Phylogenetic analysis of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4430-4435, 2006c.

WILLI, B.; BORETTI, F.S.; TASKER, S.; MELI, M.L.; WENGI, N.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. From *Haemobartonella* to hemoplasma: molecular methods provide new insights. **Veterinary Microbiology**, n. 125, n. 3-4, p.197-209, 2007a.

WILLI, B.; FILONI, C.; CATAO-DIAS, J.L.; CATTORI, V.; MELI, M.L.; VARGAS, A.; MARTINEZ, F.; ROELKE, M.E.; RYSER-DEGIORGIS, M.P.; LEUTENEGGER, C.M.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1159–1166, 2007b.

WILLI, B., BORETTI, F.S., MELI, M.L., BERNASCONI, M.V., CASATI, S., HEGGLIN, D., PUORGER, M., NEIMARK, H., CATTORI, V., WENGI, N., REUSCH, C.E., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Realtime PCR investigation of potential vectors, reservoirs and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, p. 3798–3802, 2007c.

WILLI, B., MELI, M.L., LÜTHY, R., HONEGGER, H., WENGI, N., HOELZLE, L.E., REUSCH, C.E., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Development and application of a universal hemoplasma screening assay based on the SYBR Green PCR principle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 12, 4049-4054, 2009.

WOLF-JÄCKEL, G.A., JÄCKEL, C., MUSEUX, K., HOELZLE, K., TASKER, S., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, Characterization, and Application of a Recombinant Antigen for the Serological Investigation of Feline Hemotropic Mycoplasma Infections. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 12, p. 1917-1925, 2010.

YANG, D.; TAI, X.; QIU, Y. Prevalence of *Eperythrozoon* spp. infection and congenital eperythrozoonosis in humans in Inner Mongolia, China. **Epidemiology and Infection**, v. 125, n. 2, p. 421–426, 2000.

YUAN, C., LIANG, A., YU, F., YANG, Z., LI, Z., ZHU, J., CUI, L., HAN, Y., HUA, S. *Eperythrozoon* infection identified in an unknown aetiology anaemia patient. **Annals of Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 467-469, 2007.

YUAN, C. L.; LIANG, A.B.; YAO, C.B.; YANG, Z.B.; ZHU, J.G.; CUI, L.; YU, F.; ZHU, N.Y.; YANG, X.W.; HUA, X.G. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 7, p. 890-894, 2009.

ZACHARY, J. F.; BASGALL, E. J. Erythrocyte membrane alterations associated with the attachment and replication of *Eperythrozoon suis*: a light and electron microscopic study. **Veterinary Pathology**, v. 22, n. 2, p. 164-170, 1985.

ZHANG, C.; RIKIHISA, Y. Evaluation of sensitivity and specificity of a *Mycoplasma haemomuris*-specific polymerase chain reaction test. **Comparative Medicine**, Memphis, v. 52, n. 4, p. 313-315, 2002.

ZHUANG, Q.J.; ZHANG, H.J.; LIN, R.Q.; SUN, M.F.; LIANG, X.J.; QIN, X.W.; PU, W.J.; ZHU, X.Q. The occurrence of the feline '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' in dog in China confirmed by sequence-based analysis of ribosomal DNA. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, n. 4, p. 689–692, 2009.

ZULTY, L.C., KOCIBA, G.J. Cold agglutinins in cats with haemobartonellosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 6, p. 907-910, 1990.

ANEXO



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 057/2013, referente ao projeto "Investigação da ocorrência de Micoplasmas Hemotrópicos (Hemoplasmas) em roedores (*Rattus Norvegicus*) de vida livre do Passeio Público e Zoológico de Curitiba", sob a responsabilidade de Francisco de Oliveira Conrado, na forma em que foi apresentado (uso de 60 ratas), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 11 de setembro de 2013.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 049/2013, regarding the project "Investigation of the occurrence and identification of Hemotropic Mycoplasmas (Hemoplasmas) in free-ranging rodents (*Rattus norvegicus*) from the Passeio Publico and Zoo of Curitiba", under Francisco de Oliveira Conrado's supervision, in the terms it was presented (use of 60 rats), was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on September 11, 2013.

Curitiba, 11 de setembro de 2013.

Patrick Schmidt

Presidente

Ricardo Guilherme D'Ottaviano
de Castro Vilani
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná.